低温科学

2023 Vol.81

ISSN 1880-7593

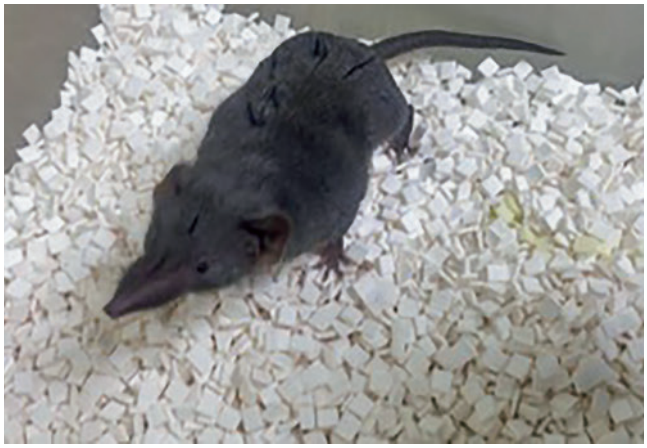
動物の寒冷適応戦略

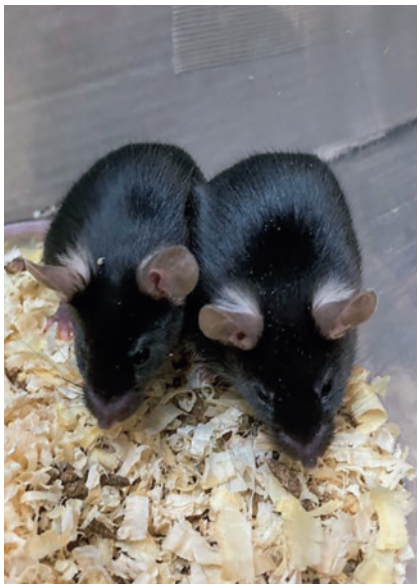
～生理生態と分子機構

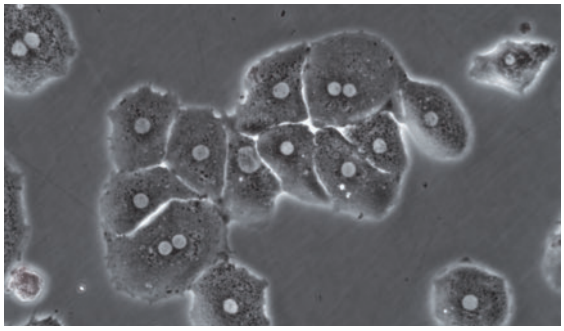
北海道大学 低温科学研究所 編

Edited by Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

ILTS







① GFP を発現する線虫 *C. elegans*（山城らの稿）
②深冬眠中のシリアンハムスター
（堀井らの稿、渡邊らの稿、曽根らの稿）
③ツキノワグマの仔（坪田の稿、下鶴の稿、宮崎の稿）
④チビトガリネズミ（大舘の稿）
⑤ヨーロッパトガリネズミ（大舘の稿）
⑥リュウキュウカジカガエル（齋藤の稿）
⑦メダカ（中山らの稿）
⑧深冬眠中のシマリス（塚本らの稿）
⑨イワナ類を咥えて歩くニホンザル
撮影：鈴木裕子氏（東城らの稿）
⑩冬眠期に強制交尾をするコキクガシラコウモリ
（佐藤の稿）
⑪オオクワガタの幼虫（山内らの稿）

⑫ショウジョウバエ（村上らの稿）
⑬スンクス（堀井らの稿）
⑭チャコウラナメクジ（宇高の稿）
⑮ニカメイガ（泉の稿）
⑯マウス（小野らの稿）
⑰ヒグマ（坪田の稿、下鶴の稿、宮崎の稿）
⑱シリアンハムスターの初代培養肝細胞（曽根らの稿）
⑲トウガレイ（津田らの稿）

はじめに

地球温暖化や水問題など，地球環境の諸問題に直面する現代に生きる我々人類にとって，地球上の多種多様な生物がいかにして環境に適応し生存しているのか，すなわち「生物の環境適応機構」，を理解しそこに学ぶ重要性は，ますます増加している．こうした疑問に科学的視点からアプローチする学問として生物学がある．生物学領域では，20 世紀後半に生じた分子生物学の発展にはじまる遺伝子工学の急速な進展を皮切りに，遺伝子配列解析技術や質量分析技術をはじめとする多様な解析技術の進歩が，21 世紀初頭前後に生じた情報革命の波と相まって生じ，それまで問いを立てても答えを得ることが難しかった諸問題に対してアプローチ可能な時代が到来している．さまざまな生物の環境適応機構は，まさにそういった問題のひとつである．

ではすぐにでも生物学上の諸問題が解明できるのかというと，そうはいかないのが実情である．実際には，自然界での生態がまだ不明であったり，実験室環境での飼育・繁殖がそもそも困難であったり，研究に要するスペースや時間などの物理的問題，さらには倫理的問題など，まさにその生物固有の性質に起因する諸問題が立ちはだかる．また生物の環境適応と一口に言っても，微生物・植物・動物といった生物種の違い，生理上の違い，生息域・季節などの環境条件の違いなど，その含むところは極めて多岐にわたる．多様性と普遍性という，生物を理解する上で必要な両輪のもと，生態・生理から分子機構の研究まで，幅広い分野の研究者が相互交流しつつ，より深い理解を目指して研究を推進することが，まさに今の時代に必要と言える．

このような状況下で，「動物の寒冷適応戦略」という，フォーカスを絞ったテーマで研究分野を俯瞰することは，寒冷適応研究の最新地点と今後の課題を把握するという意味で，日本の科学コミュニティのみならず，その将来を担う若い学生たちにとっても意義があると考え，本特集「低温科学」第 81 号を企画した．「低温科学」は，「寒冷圏および低温条件の下における科学的現象に関する学理及びその応用の研究」をミッションとして掲げる，北海道大学附置研究所である低温科学研究所が刊行する特集号である．生物が，寒冷・低温環境下でいかに生き抜いてきたかを理解することは，低温科学研究所のミッションそのものとも言える．本特集では，多岐に渡る動物の寒冷環境適応機構について，無脊椎動物から脊椎動物まで幅広い生物種について，生態・生理機構から細胞・分子レベルの機構まで，さまざまな視点で研究し活躍してきた方々に，最近の研究成果を取り入れた解説記事を執筆していただいた．これにより本特集は，他に類をみない，多様な視点から動物の寒冷適応戦略を俯瞰する解説集となった．編集委員一同，ご寄稿頂いた著者の方々に感謝するとともに，本特集が，幅広い興味を持つ読者の方々の理解の一助となり，新たな研究展開やさらなる発展の契機となれば幸いである．

「低温科学」第 81 巻編集委員会
編集委員長：山口良文（北海道大学・低温科学研究所）
編集委員：落合正則（北海道大学・低温科学研究所）
：曽根正光（北海道大学・低温科学研究所）
：山内彩加林（北海道大学・低温科学研究所）

目次

はじめに

第一章：変温動物

ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害回避機構 …… 泉　洋平　1

ナメクジ類の越冬戦略 …… 宇高　寛子　11

線虫 *C. elegans* の低温耐性・馴化における全身周回性の神経回路による腸の脂肪蓄積の制御
…… 山城　芹奈，寺西　宏顕，本村　晴佳，太田　茜，久原　篤　19

膜脂質を介する低温適応の新規メカニズムの発見：細胞自律的な細胞内温度制御
…… 村上　光，長尾　耕治郎，梅田　眞郷　27

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 …… 山内　彩加林，津田　栄　37

不凍タンパク質の構造と機能 …… 津田　栄，新井　達也　51

メダカに学ぶ脊椎動物の冬季適応戦略 …… 中山　友哉，吉村　崇　61

脊椎動物における温度受容機構の進化的変化と環境適応のつながり …… 齋藤　茂　71

第二章：恒温動物（哺乳類）

冬眠しないトガリネズミの越冬戦略 …… 大舘　智志　81

コウモリの越冬生態　―冬のエネルギー配分に関わる多様な行動特性と気候変動の影響について― …… 佐藤　雄大　89

哺乳類の寒冷適応における褐色脂肪組織の役割 …… 加藤（鈴木）　美羅，岡松　優子　99

概日時計の温度補償性と Ca^{2+} シグナルの役割 …… 金　尚宏，榎木　亮介　109

シマリスの冬眠の分子生物学的研究 …… 塚本　大輔，高松　信彦　119

実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導 …… 堀井　有希，椎名　貴彦，志水　泰武　131

人工冬眠の実現にむけた休眠研究の取り組み …… 小野　宏晃，砂川　玄志郎　141

シリアンハムスターの冬眠を制御する中枢神経機構 …… 渡邊　正知，田村　豊　149

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？ …… 曽根　正光，山口　良文　159

クマ類の冬眠　―繁殖との関係― …… 坪田　敏男　173

クマの冬眠の生理・代謝機構　～如何に太り，如何に痩せるか～ …… 下鶴　倫人　181

ツキノワグマにおける冬眠期の筋肉量維持機構の探索 …… 宮﨑　充功　191

世界最寒冷地に生息するサル類・上高地のニホンザル群で進化した水生昆虫や魚類の捕食行動
…… 東城　幸治，竹中　將起　199

低温科学 81 （2023） 1-9
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 1

ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害回避機構

泉　洋平[1)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 10 日受理

ニカメイガは秋期の日長の短縮に反応して終齢幼虫で休眠に入り，その後の低温により凍結耐性を獲得する．これにより，－25℃の低温にさらされて体液が凍結しても生存することが可能となる．低温順化によりニカメイガ越冬幼虫は体液中にグリセロールを蓄積しており，凍結時にアクアポリンを介して細胞内の水と体液中のグリセロールの速やかな置換を行うことで，凍結耐性をもつ昆虫種であっても致死的となる細胞内凍結を回避している．この凍結障害回避機構は，休眠とその後の低温順化がなければ発現することはなく，グリセロール存在下であっても，非休眠幼虫や低温順化を受けていない休眠幼虫の組織では凍結障害を回避できない．

Freezing damage avoidance mechanism of overwintering larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker.

Yohei Izumi[1]

Overwintering larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* obtain freezing-tolerance to about −25℃ by the accumulation of glycerol in the hemolymph. However, non-diapausing larvae (in the summer season) cannot survive freezing. To prevent intercellular freezing, which causes death in overwintering larvae, water leaves and glycerol enters fat body cells through water channels 'aquaporin' during freezing. Fat body tissue isolated from non-acclimated diapausing and non-diapausing larvae cannot avoid freezing injury even when glycerol is present. Only fat body tissue isolated from cold-acclimated diapausing larvae can avoid freezing injury in the presence of glycerol. Moreover, in radiotracer experiments, water and glycerol displacement is observed only in cold-acclimated diapausing larvae. Therefore, in larvae of the rice stem borer, both diapause and cold-acclimation are essential to accumulate glycerol and activate aquaporin for the avoidance of freezing injury.

キーワード：ニカメイガ，耐凍性，休眠，低温順化，アクアポリン
Chilo suppressalis, freezing-tolerance, diapause, cold-acclimation, aquaporin

1．はじめに

昆虫の低温耐性は体液が凍結しても耐えることのできる凍結耐性と，凍結しないように過冷却点を下げる凍結回避性の 2 つに分けることができる（Storey and Storey, 1992; Bale, 2002; Danks, 2005）．温帯および寒帯に生息している昆虫の多くは凍結回避性であり，凍結耐性をもつ昆虫の多くはさらに寒さの厳しい地域に生息している．凍結耐性を持つ種が冬期の低温が厳しい地域に多く分布していることから，凍結耐性の獲得が厳しい低温での生存に有効であると考えられるが，同じ地域には非常に低い過冷却点をもつ凍結回避性の種も存在するため，冬期の低温にどちらの耐性がより適応的であるかといった結論は未だ出ていない．

連絡先
泉　洋平
島根大学生物資源科学部
〒690-8504　島根県松江市西川津町 1060
Tel. 0852-32-6527
e-mail：yohei@life.shimane-u.ac.jp
1）島根大学生物資源科学部
Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, Japan

凍結回避性の昆虫にとって凍結は致命的であるため，これらの種は過冷却点を下げることにより，組織及び体液の液相を維持している（Salt, 1936）．過冷却能力は，トレハロースなどの糖や，グリセロールなどの糖アルコールの蓄積により増強され，多くの場合厳寒期に最も高い過冷却能力を示す（Sø mme, 1982）．また，不凍タンパク質も過冷却点の低下および過冷却状態の安定に関与していると考えられている（Zachariassen and Husby, 1982）．

凍結耐性の昆虫も凍結回避性の昆虫と同様に越冬時に糖や糖アルコール，不凍タンパク質（山内の稿参照）を体内に蓄積するが，その役割は異なると考えられている．凍結耐性を持つ昆虫は氷核物質を持っており，それらが氷点下の比較的高い温度での体液の凍結を誘導する（Zachariassen and Hammel, 1976; Duman, 2001; Bale, 2002）．昆虫の氷核物質は大きく内因性氷核と外因性氷核に分類される．内因性氷核には昆虫自身が生成する氷核タンパク質や氷核リポタンパク質が，外因性氷核には消化管内の食物残渣，氷核活性をもつ微生物などがある．これらの氷核物質を用いて，凍結耐性を持つ昆虫は体液の凍結を誘導するため，凍結耐性を持つ昆虫の不凍タンパク質は，凍結回避性の昆虫の不凍タンパク質のように過冷却点を下げることには寄与せず，融解時の再凍結による氷結晶成長を抑制することで機能していると考えられている．また，糖や糖アルコールは体液中や組織内に蓄積することで，凍結による傷害を軽減しているとされている（Lee, 1991）．

ニカメイガ *Chilo suppressalis* はチョウ目ツトガ科に属し，東南アジアから西南アジアにかけて広く分布しており，日本では沖縄から北海道まで広く分布している（積木　1998）．幼虫はイネなどの茎内に潜入して食害する．1960 年ごろまでは日本において稲作に甚大な被害をもたらす，最も重要なイネ害虫であった．しかし，1970 年代以降は急激に密度が低下し，現在では一部の地域を除いて，水田内での本種の捕獲は困難になっている．ニカメイガは基本的には年に 2 回発生する年二化の生活史を持つが，東北地方北部や北海道では年一化の生活史を持っている．日長が短くなる秋期に休眠に入り終齢幼虫で越冬する．休眠誘導後の外気温の低下にともなって体内にグリセロールを多量に蓄積し，筋肉および表皮に氷核物質を生成することで 1 月中旬から 2 月にかけて −25℃ もの低温に耐えることができるようになる（Tsumuki & Kanehisa, 1978; Tsumuki, 1990; Tsumuki & Konno, 1991; Hirai & Tsumuki, 1995）．越冬幼虫の過冷却点が −15℃ 前後であることから，ニカメイガ越冬幼虫は温帯域に生息する昆虫では珍しく凍結耐性をもっているといえる．しかし，夏期に生育する第 1 世代幼虫は，短日による休眠誘導を受けないために非休眠であり，本幼虫を低温にさらしても，グリセロールを蓄積することはできず凍結には耐えることはできない（積木　1998）．

2．凍結障害回避におよぼす細胞膜の水とグリセロール輸送の役割

Polge ら（1949）によるグリセロールの凍結障害防御効果の発見以来，細胞の凍結障害の発生機構と凍結保護物質の作用が多くの研究者によって研究されてきたが，まだ充分に解明されていない．それは，凍結による溶液の物理的変化には一定の法則性があるが，細胞の性質は組織によって異なり，凍結に対する感受性が大きく異なるため，凍結障害の発生機構と凍結保護物質の作用に一定の法則性を見いだすのが難しいためと考えられている（Lovelock, 1953; Doebbler, 1966; Takahashi & Hirsh, 1985）．冷却速度を速くすると細胞は細胞内凍結を起こしやすくなる（Mazur, 1984）．これは，冷却速度が早いと細胞内の水の多くが細胞内に残って過冷却され，その後の細胞外からの植氷により細胞内凍結を起こすためである（植氷については宇高の稿参照）．組織細胞により異なるものの生存率が最も高くなる最適冷却速度が存在し，最適冷却速度より早い冷却速度での生存率の低下は細胞内の氷晶形成に起因すると考えられている．細胞内の氷晶形成は，細胞内微細構造の破壊，細胞内の形態変化，呼吸や各種酵素活性の低下，細胞分裂能や細胞運動能の損失等を引き起こし，凍結障害を誘導する（Mazur, 1984）．

Lovelock（1953）は凍結保護物質として具備すべき条件として，低分子であること，低温においても水溶性が高く高濃度に濃縮可能であること，毒性が少ないこと，細胞内に容易に透過しうることを提案している．このような物質は，その束一性（凝固点降下のようにその物質の化学的組成には関係なく，溶質の濃度だけによって決定される性質）により溶液の凍結温度を効果的に下げ，氷晶形成量を減らし細胞内外の塩濃度の濃縮を抑える効果が高い．このことは，塩害説（赤血球では一定以上に塩濃度が高まると，細胞膜脂質の一部に分解がおこり，それにより膜透過性が増大し，融解時に溶血がおこるという説）の凍結障害を引き起こす要因である細胞内外の塩濃度が細胞膜を変成するほど高まらず，最小容積説（細胞には収縮可能な容積に限界があり，それを超えて収縮すると細胞膜にストレスがかかり半透性を失うという

説）における凍結障害の要因である脱水収縮が細胞が障害を受けるほどおこらないことを意味する．このように細胞膜を通過して拡散しうる凍結保護物質は“細胞膜透過型凍結保護物質”と呼ばれ，グリセロールやジメチルスルホキシド（DMSO）がその代表的なものである（Shlafer, 1981）．これらはその束一性により氷晶形成量を抑制するとともに，凍結下での溶液の物理化学的状態を大きく変える．グリセロール溶液ではグリセロールの濃度が高くなるに従い凍結温度が降下する．氷晶核を持たない溶液も－38℃に冷却されると水分子の集合による均質的氷晶核（homogeneous ice nuclei）が形成されて凍結を開始するが，グリセロールの濃度が高くなるに従って均質的氷晶核が形成される温度も下降し，グリセロール濃度 40％では－50℃以下になる（Rasmussen & Luyet, 1970）．このことは，細胞にとっては過冷却能力が増大することを意味し細胞内凍結が起こりにくくなることを示している．しかし，実際には高濃度のグリセロールは細胞にとって有害である．DMSO に比べて膜透過性が低いことから，融解時に急速な水の細胞内侵入に見合うだけのグリセロールの細胞外への排出がともなわず，細胞が膨潤して障害を受けてしまう．これらの理由から，凍結保存におけるグリセロールの最適濃度は 10～15％程度であるとされている．

近年，多くの研究により細胞の凍結保存を成功させるには細胞膜を介した水と凍結保護物質の置換が重要であることが明らかにされている．水と凍結保護物質の細胞膜を介した置換には，浸透圧によるものと水チャネルよるものがある．アクアポリンと呼ばれる水チャネルタンパク質は多くの高等動物や植物で報告されている（Maurel, 1997; Benos et al., 2001; Chumont et al., 2001）．また，いくつかの昆虫種においても報告されている（Beuron et al., 1995; Le Caherec et al., 1996a, b; Pietrantonio et al., 2000; Azuma et al., 2012）．アクアポリンは，選択的に水のみを通すものと，水と同時にグリセロールのような物質を通すものが知られている（Tyerman et al. 2002）．アクアポリンによる水の輸送は塩化水銀（$HgCl_2$）により阻害される（Preston et al., 1992）．それは，砂時計型をしているアクアポリンの最も細くなっている部分に水銀分子が結合することにより水の輸送を阻害すると報告されている（Murata et al., 2000）．アクアポリンと凍結耐性との関連は以下に述べるいくつかの生物種ですでに報告されている．酵母菌の研究では，凍結耐性を持つ系統でのみアクアポリンが発現していたと報告されている（Tanghe et al., 2002）．また，凍結耐性を持たない系統でアクアポリンを過剰発現させると凍結耐性を持つことも確認されている（Tanghe et al., 2002）．哺乳類の卵細胞ではグリセロールに対する透過性が低いためにグリセロールベースの保存液での凍結保存の成功例は報告されていなかった．しかし，Edashige et al（2003）は，マウス卵細胞にアクアポリン-3（AQP3）を人工的に発現させることでグリセロールベースの溶液での凍結保存を成功させている．AQP3 は哺乳類において，水だけではなくグリセロールや尿素なども通すことのできるアクアグリセロポリンというグループに属しており，卵細胞ではほとんど発現しておらず，凍結耐性の高い桑実胚（受精卵が細胞分裂を繰り返し 16 個から 32 個まで分裂した状態）になると強く発現するようになりグリセロールの膜透過性が高くなることが知られている．

ニカメイガ越冬幼虫においても，アクアポリンを介した水とグリセロールの速やかな置換が凍結障害の回避に重要であることが明らかとなった．死細胞を染色するトリパンブルー染色法を用いて各器官と個体死との関係を評価したところ，凍結耐性を持たない非休眠幼虫では，－10℃に 4 時間暴露すると脂肪体に大きな障害を受けた個体が死亡することが明らかとなった．一方で凍結耐性をもつニカメイガ越冬幼虫を半数致死温度である－25℃に 24 時間暴露すると，中腸に障害を受けた個体は死亡し，受けなかった個体は生存することができる（Izumi et al., 2005）．しかしながら，死亡個体，生存個体ともに脂肪体には大きな障害は見られなかった．越冬幼虫，非休眠幼虫それぞれの脂肪体を摘出して，グレース昆虫培養培地内で凍結させると両者とも大きな障害受ける．そこにグリセロールを加えると越冬幼虫の脂肪体は障害を受けないが，非休眠幼虫の脂肪体は障害を受ける（Izumi et al., 2006）．このことは，非休眠幼虫が凍結に耐えることができないのは体内にグリセロールを蓄積することができないためだけではなく，それを効果的に利用する機構を持っていないためであることを示している．また，グリセロールを添加したグレース培地に $HgCl_2$ を加えて凍結させると，越冬幼虫の脂肪体も傷害を受ける（図 1）．水銀はアクアポリンの活性を阻害することが知られていることから，この結果は越冬幼虫脂肪体の凍結障害の回避にアクアポリンが大きな役割を担っていることを示唆している．

［^{14}C］グリセロールと［^{3}H］H_2O を用いた，トレーサー実験により，冷却から凍結に至る過程における脂肪体組織内の水とグリセロールの動態を調査したところ，5℃で処理すると，越冬幼虫の脂肪体はグリセロールを取り込み，30 分で最大値（約 160 ng/mg）に達した．しかし，

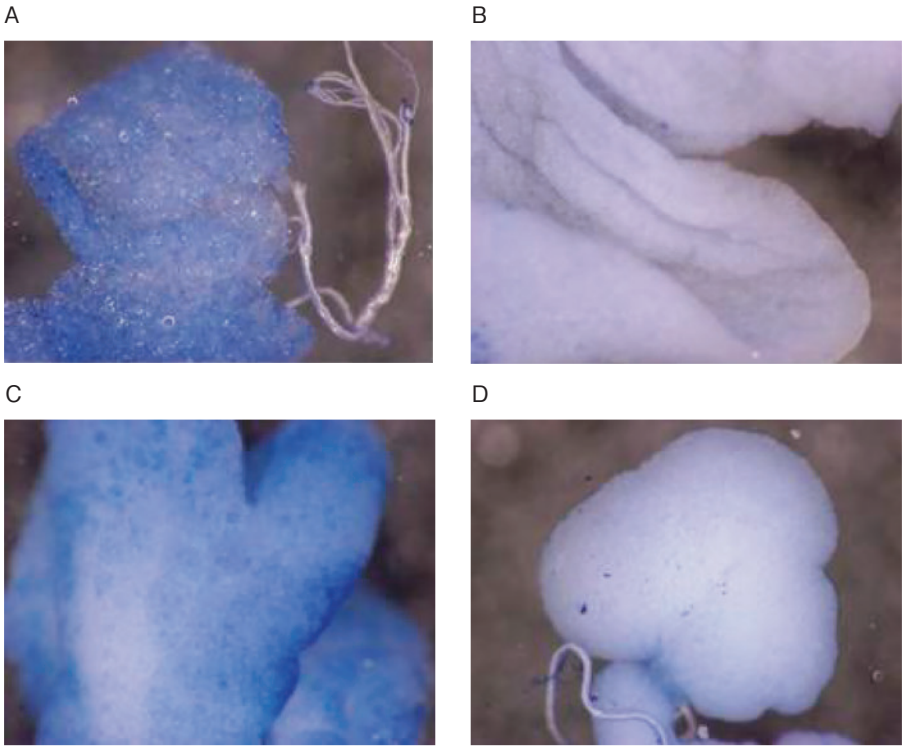


図 1：－20℃，2 時間処理におけるニカメイガ越冬幼虫脂肪体の傷害．
A グレース昆虫培養培地，B グレース昆虫培養培地＋グリセロール，C グレース昆虫培養培地＋グリセロール＋ $HgCl_2$，D グレース昆虫培養培地＋グリセロール＋ $HgCl_2$　5℃処理．（Izumi et al., 2006 より引用）

$HgCl_2$ を添加した培地では 5℃で 120 分処理してもほとんど取り込まなかった．非休眠幼虫の脂肪体では $HgCl_2$ の添加に関わりなく，グリセロールは脂肪体内にほぼ取り込まれなかった．また，5℃でグリセロールを取り込ませた後に－20℃まで冷却し培地を凍結させると，越冬幼虫の脂肪体では細胞内の水が細胞外に流出する一方，グリセロールは細胞外から細胞内に流入した．しかし，$HgCl_2$ を添加した培地中では，脂肪体内の水とグリセロールの量はほとんど変化しなかった（図 2）．これらの結果から，ニカメイガ越冬幼虫は体液中にグリセロールを蓄積させ，凍結時にアクアポリンを介して細胞内の水と体液中のグリセロールを速やかに置換することで，細胞内凍結が引き起こす凍結障害を回避していると考えられた（Izumi et al., 2006）．－50℃と非常に低い温度での凍結耐性を持つホシマダラバエの一種 *Eurosta solidaginis* においても，凍結耐性とアクアポリンとの関係が報告されている（Philip et al., 2008）．アクアポリンのなかでも，水のほかにグリセロールなどの低分子の物質を通すことのできるアクアグリセロポリンであるヒト AQP3 の抗体を用いて，低温時にヒト AQP3 様タンパク質の発現量が増加することを明らかにするとともに，水銀処理により凍結時に細胞死が引き起こされることが明らかになっている（Philip et al., 2008）．また，AQP3 様タンパク質の季節変化では，厳寒期にむけて膜画分における AQP3 様タンパク質の量が増加することも明らかにされている（Philip and Lee, 2010）．以上の結果より，凍結保護物質としてグリセロールを蓄積させる昆虫種の凍結耐性にはアクアポリンが深く関わっていることが示唆される．

3．凍結障害回避における休眠と低温順化の役割

いくつかの昆虫種の例外を除いて，多くの昆虫種では厳しい冬の寒さに耐えるためには，休眠と低温順化が不可欠である（Denlinger, 1991; Hodkova and Hodek, 2004; Danks 2005, 2006）．昆虫の主な凍結保護物質であるグリセロールなどの糖アルコールの合成と休眠との相互関係は三つのタイプにわけられる（Sø mme, 1982）．一つ目は糖アルコールの合成が休眠に関係なく低温のみによって誘導されるタイプ，二つめは外気温に関係なく休眠に入るだけで糖アルコールが合成されるタイプ，三つめは糖アルコールの合成に休眠と低温順化の両方を必要とするタイプである．ニカメイガでは，短日条件で誘導された休眠幼虫を低温順化したときにグリセロールは蓄積されるが，長日条件で飼育した非休眠幼虫ではたとえ低温順化してもグリセロールは蓄積されない（Tsumuki

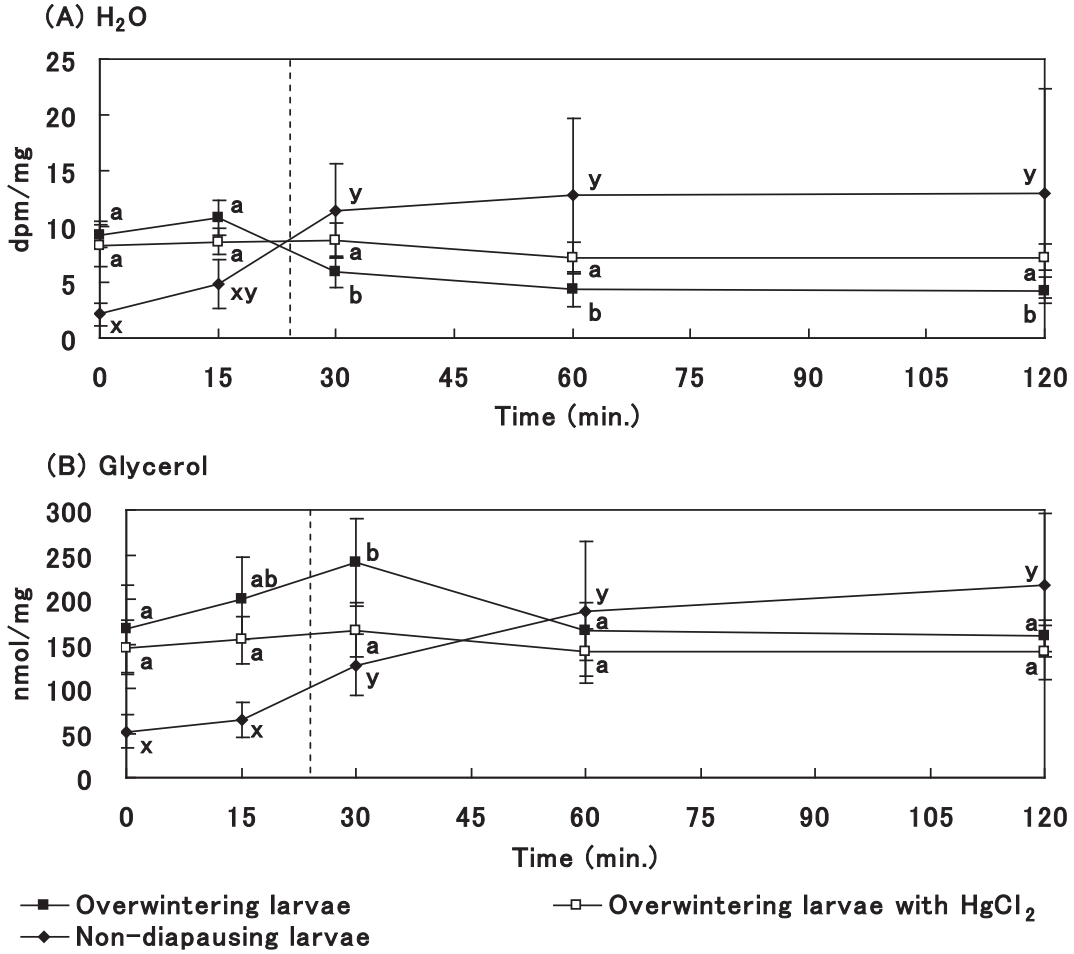


図 2：凍結時の水およびグリセロールの動態
（A）水　（B）グリセロール　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2006 より引用）

& Kanehisa, 1980）．これらのことから，ニカメイガ幼虫は三つめのタイプであるといえる．しかしながら，ニカメイガ幼虫の凍結耐性はグリセロールが存在することだけでは獲得されない．

前述したように，越冬幼虫から取り出した脂肪体は，グリセロールを添加したグレース昆虫培養培地では－20℃で凍結させてもほとんど障害を受けないが，非休眠幼虫の脂肪体は非常に強い障害を受ける．また，越冬幼虫の脂肪体では，アクアポリンの関与により凍結過程で細胞外に水が流出し，細胞内にグリセロールが流入する．一方で，非休眠幼虫の脂肪体ではこのような機構はみられない．しかし，越冬幼虫は休眠と低温順化の両方を受けているため，この凍結障害回避機構には休眠と低温順化のどちらが重要なのか，もしくは両方が必要であるのかどうかは前述の実験ではわからない．そこで，凍結障害回避機構と休眠および低温順化との関係を明らかにするために，低温順化した，または順化していない休眠幼虫と非休眠幼虫の，脂肪体の凍結障害，および水とグリセロールの輸送について調査した．

各グループの幼虫より摘出した脂肪体の－20℃における凍結障害の程度を Table 1 に示した．グリセロールを添加していない培地で凍結させると，すべてのグループの幼虫の脂肪体は 60％以上の領域がトリパンブルーにより青く染色され細胞傷害を受けていた．グリセロールを添加した培地の中で凍結させても，低温順化した非休眠幼虫の脂肪体は $HgCl_2$ の添加，無添加に関わらず 60％以上の領域が染色された．グリセロールを添加した培地の中で，低温順化していない休眠幼虫の脂肪体を凍結すると，約 50％の領域が染色されたが，この染色領域は非休眠幼虫と比べると有意に小さかった．一方，低温順化した休眠幼虫の脂肪体はグリセロールを添加した培地の中で凍結させると，ほとんど染色されなかった．しかし，培地に $HgCl_2$ を添加して凍結させると，低温順化しなかった休眠幼虫と同じ程度（約 50％）染色された．

［^{14}C］グリセロールと［^{3}H］H_2O を用いた，トレーサー実験において，低温順化した休眠幼虫の脂肪体だけが，越冬幼虫の脂肪体と同様の動態を示した．低温順化した，および低温順化しなかった非休眠幼虫の脂肪体では

表 1：様々な培地における脂肪体の凍結傷害

Temperature	Medium	Blue colored area in fat body tissues (%)			
		Non-diapausing larvae		Diapausing larvae	
		Non-acclimated	Cold-acclimated	Non-acclimated	Cold-acclimated
5℃	Grace's medium	4.2±1.0a	4.0±0.5a	3.9±0.7a	3.8±0.5a
	Grace's medium with 0.25M glycerol	4.0±0.8a	4.1±0.7a	3.7±0.5a	4.0±0.6a
	Grace's medium with 0.25M glycerol and 0.2mM $HgCl_2$	3.5±0.8a	3.9±0.6a	4.2±0.9a	3.8±0.6a
−20℃	Grace's medium	68.5±8.4c	66.7±6.4c	64.3±7.9c	65.3±9.4c
	Grace's medium with 0.25M glycerol	65.3±7.5c	65.9±8.2c	48.4±9.8b	4.1±0.5a
	Grace's medium with 0.25M glycerol and 0.2mM $HgCl_2$	67.4±9.8c	66.1±5.3c	50.2±7.7b	49.9±9.3b

平均±標準誤差，異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す（$p<0.05$）（Izumi et al., 2007 より引用）

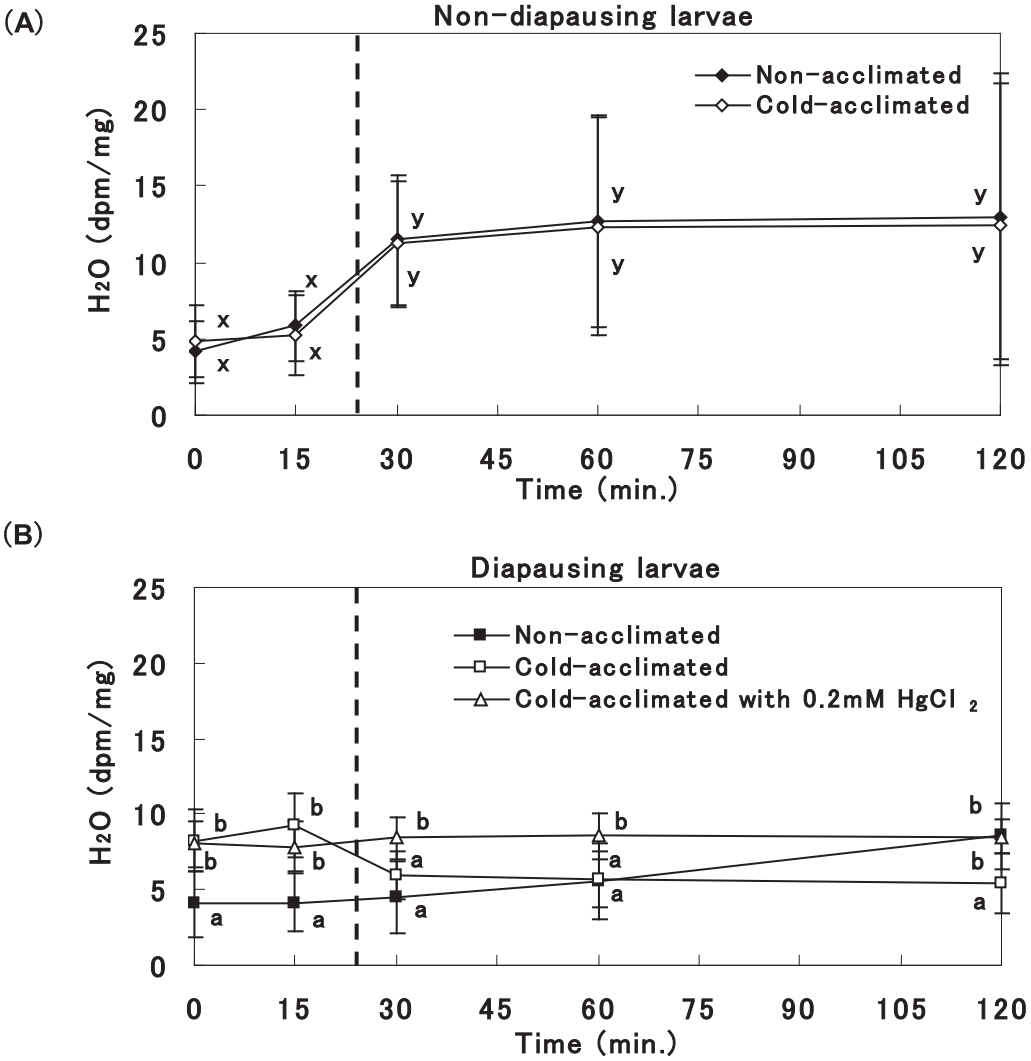


図 3：凍結時の水の動態
（A）非休眠幼虫　（B）休眠幼虫　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2007 より引用）

温度が下がるにつれて細胞内に水およびグリセロールの両方が急速に流入した．低温順化していない休眠幼虫の脂肪体においても水およびグリセロールの細胞内への流入が見られたが，非休眠幼虫よりも緩やかであった（図 3, 4）．これらの結果は，ニカメイガ幼虫における凍結障害の回避機構は休眠とその後の低温順化によりもたらさ

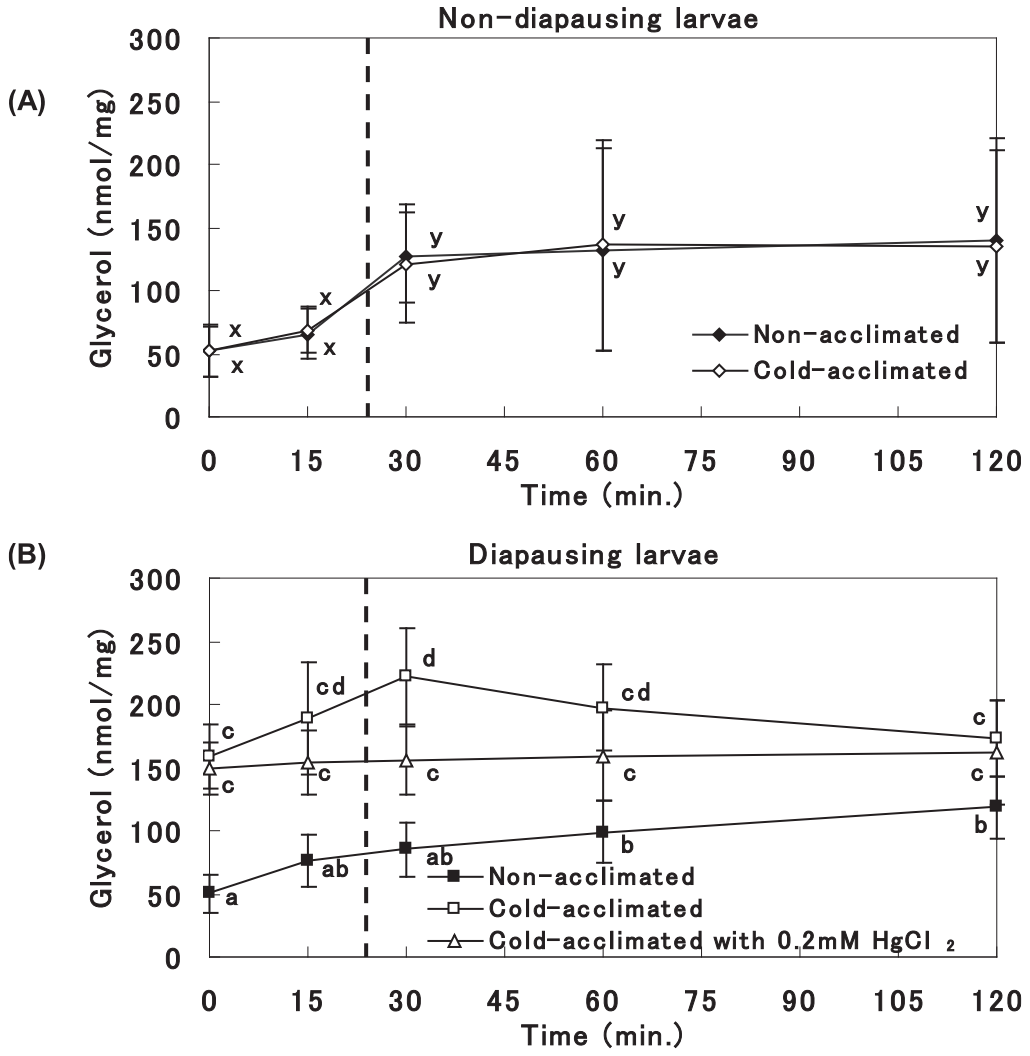


図 4：凍結時のグリセロールの動態
（A）非休眠幼虫　（B）休眠幼虫　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2007 より引用）

れることを示唆している（Izumi et al., 2007）.

休眠に入るだけでは，脂肪体は凍結障害回避機構を獲得することができないことが明らかとなった．野外では, ニカメイガ幼虫の休眠は初秋に誘導され, グリセロールはその後の低温により蓄積され，幼虫の凍結耐性は体内のグリセロール濃度の上昇とともに高くなり，1 月中旬に最も高くなる（Tsumuki and Kanehisa, 1978; Tsumuki, 1990）．グリセロールは脂肪体で合成され体液中に放出され蓄積されるが，細胞膜を介した単純拡散によるグリセロールの透過性は非常に低いため，大量のグリセロールを体液中に放出するためには輸送する機構が存在すると考えられる．これまでの結果から，この機構にアクアポリン（アクアグリセロポリン）が関与しており，凍結時にはそれが速やかな水とグリセロールの置換を促していると推定される．中国の研究グループによりニカメイガの全ゲノム情報は公開されており，アクアポリンおよびアクアグリセロポリンと推定される遺伝子が存在することは明らかとなっているが，残念ながら今のところ脂肪体における水とグリセロールの輸送に関与するアクアポリン（アクアグリセロポリン）は特定できていない.

4. おわりに

ここまで，ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害の回避機構について，主に細胞内凍結を回避するためのアクアポリン（アクアグリセロポリン）を介した水とグリセロールの置換について述べてきた．しかし，凍結耐性を持つ昆虫における凍結障害の回避はこれだけで達成されるものではなく，低温下での細胞膜流動性の維持に寄与するリン脂質の脂肪酸組成の変化（Izumi et al., 2009）や，不凍タンパク質等による体液における氷結晶成長の抑制

など様々な機構が組み合わさって達成されている．それぞれの機構の個々の詳細な役割と発現条件，および機構同士の相互作用を明らかにすることができれば，昆虫の凍結障害回避機構に関する研究の新たな展開が期待できると考えられる．

参考文献

Azuma, M., T. Nagae, M. Maruyama, N. Kataoka, and S. Miyake. (2012) Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology* **58**: 523–533

Bale, J. S. (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society* B, **357**, 849–862.

Benos D. S., Simon, S. Hohmann, P. Agre, and S. Nielsen (Eds.) (2001) *Aquaporins. Current Topics in Membranes*, vol. 51. Academic Press, New York

Beuron, F., F. Le Caherec, M. T. Guillam, A. Cavalier, A. Garret, J. P. Tassan, C. Delamarche, P. Schultz, V. Mallouh, J. P. Rolland, J. F. Hubert, J. Gouranton, and D. Thomas (1995) Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *Journal of Biological Chemistery* **270**: 17414–17422.

Chaumont, F. B., E. Wojcik, M. J. Chrispeels, and R. Jung (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*. **125**, 1206–1215.

Danks, H. V. (2005) Key themes in the study of seasonal adaptations in insects I. Patterns of cold hardiness. *Applied Entomology and Zoology* **40**, 199–211.

Danks, H. V. (2006) Key themes in the study of seasonal adaptations in insects II. Life-cycle patterns. *Applied Entomology and Zoology* **41**, 1–13.

Denlinger, D. L. (1991) Relationship between Cold Hardiness and Diapause. Lee, R. E. and Denlinger, D. L. (ed.), *Insect at Low Temperature*, Chapman and Hall, New York and London, pp. 174–198.

Doebbler, G. F. (1966) Cryoprotective compounds. Review and discussion of structure and function. *Cryobiology* **3**, 2–11.

Duman, J. G. (2001) Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*. **63**, 327–357.

Edashige, K., Y. Yamajia, F. W. Kleinhans, and M. Kasai (2003) Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction* **68**, 87–94.

Hirai, M. and H. Tsumuki (1995) Characterization and localization of the ice-nucleating active agents in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Cryobiology* **32**, 209–214.

Hodkova, M. and I. Hodek (2004) Photoperiod, diapause and cold-hardiness. *European Journal of Entomology* **101**, 445–458.

Izumi, Y., S. Sonoda, H. Yoshida, and H. Tsumuki (2005) Identification of tissues showing the lowest tolerance to freezing in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Physiological Entomology* **30**, 324–331.

Izumi, Y., S. Sonoda, H. Yoshida, H. V. Danks and H. Tsumuki (2006) Role of membrane transport of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology* **52**, 215–220.

Izumi Y, S, Sonoda and H. Tsumuki (2007) Effects of diapause and cold-acclimation on the avoidance of freezing injury in fat body tissue of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Journal of Insect Physiology* **53**, 685–690.

Izumi, Y., C. Katagiri, S. Sonoda and H. Tsumuki (2009) Seasonal changes of phospholipids in last instar larvae of rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological Science* **12**, 376–381.

Le Caherec, F., P. Bron, J. M. Verbavatz, A. Garret, G. Morel, A. Cavalier, G. Bonnec, D. Thomas, J. Gouranton, and J. F. Hubert (1996a) Incorporation of proteins into (Xenopus) oocytes by proteoliposome microinjection: functional characterization of a novel aquaporin. *Journal of Cell Science* **109**, 1285–1295.

Le Caherec F. S., Deschamps, C. Delamarche, I. Pellerin, G. Bonnec, M. T. Guillam, D. Thomas, J. Gouranton, and J. F. Hubert (1996b) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin: functional comparison with aquaporin 1. *European Journal of Biochemistry* **241**, 707–715.

Lovelock, J. E. (1953) The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* **11**, 28–36.

Maurel, C. (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annual *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 399–429.

Mazur, P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology*. Cell physiology **16**, 125–142.

Philip, B. N., S.-X. Yi, M. A. Elnitsky, and R. E. Lee (2008) Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 1114–1119.

Philip, B. N. and R. E. Lee (2010) Changes in abundance of aquaporin-like proteins occurs concomitantly with seasonal acquisition of freeze tolerance in the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Insect Physiology* **56**, 679–685.

Pietrantonio P. V., C. Jagge, L. L. Keeley, and L. S. Ross (2000) Cloning of an aquaporin-like cDNA and in situ hybridiza-

tion in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Insect Molecular Biology* **9**, 407–418.

Polge, C., A. U. Smith, and A. S. Parkes (1949) Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* **164**, 666–666.

Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre (1992) Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385–387.

Rasmussen, D. and B. Luyet (1970) Contribution to the establishment of temperature-concentration curves of homogeneous nucleation in solutions of some cryoprotective agents. *Biodynamica* **11**, 33–44.

Shlafer, M. (1981) Pharmacological considerations in cryopreservation. In Karow, A. M. & Pegg, D. E. (Ed) *Organ Preservation for Transplantation* Maecell Dekker, New York. pp. 177–212.

Sø mme, L. (1982) Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology* **73A**, 519–543.

Storey, K. B. and J. M. Storey (1992) Biochemical adaptations for winter survival in insects. In: Steponkus, P. L. (Ed.), *Advances in Low-temperature Biology 1*. JAI Press Ltd, London, pp. 101–140.

Takahashi, T. and A. Hirsh (1985) Calorimetric studies of the state of water in deeply frozen human monocytes. *Biophysical Journal* **47**, 373–380.

Tanghe, A. P. V. Dijck, F. Dumortier, A. Teunissen, S. Hohmann, and M. J. Thevelein (2002) Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied Environmental. Microbiology*. **68**, 5981–5989.

Tsumuki, H. and K. Kanehisa (1978) Carbohydrate content and oxygen uptake in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie*, Okayama Universität **17**, 95–110.

Tsumuki, H. and K. Kanehisa (1980) Effect of low temperature on glycerol and trehalose concentration in haemolymph of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* **24**, 189–193.

Tsumuki, H. (1990) Environmental adaptations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* and the blue alfalfa aphid, *Acyrthosiphon kondoi* to seasonal fluctuations. In: Hoshi M, Yamashita O (eds) *Advances in Invertebrate Reproduction*, vol. 5. pp. 273–278 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Tyerman, S. D., C. M. Niemietz, and H. Bramley (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* **25**, 173–194.

Zachariassen, K. E. and J. A. Husby (1982) Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature* **298**, 865–867.

Zachariassen, K. E. & H. T. Hammel (1976) Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing. *Nature* **262**, 285–287 .

低温科学 81 （2023） 11-18
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 11

ナメクジ類の越冬戦略

宇高　寛子[1)]

2022 年 12 月 27 日受付，2023 年 1 月 6 日受理

地球上のほとんどの場所で環境は季節的に変化している．冬の低温は変温動物である無脊椎動物にとって，生存に関わる重要な環境要因である．無脊椎動物の低温耐性は，節足動物，特に昆虫において広く研究されてきた．その一方で，昆虫と同様に地上で冬を過ごす陸貝，主にナメクジ類の低温耐性を含めた季節適応機構の研究は進んでいない．本論文では，著者が対象としてきたチャコウラナメクジでの生活史や低温耐性研究の成果および，他のナメクジ類での低温耐性研究を紹介する．

Overwintering strategy in terrestrial slugs

Hiroko Udaka[1]

The environment changes seasonally in most parts of the earth. Low temperature in winter is an important environmental factor in the survival of invertebrates. Cold tolerance in invertebrates has been extensively studied in arthropods, mainly insects. On the other hand, the mechanisms of seasonal adaptation, including overwintering strategy, in terrestrial mollusks, especially slugs have not been well understood. This paper introduces the researches of life cycle and cold tolerance in the terrestrial slug, *Ambigolimax valentianus*. In addition, previous studies of cold tolerance in other terrestrial slugs are briefly reviewed.

キーワード：陸貝，季節適応，光周性，温度順化，低温耐性
Terrestrial mollusks, seasonal adaptation, photoperiodic response, acclimation, cold tolerance

1．無脊椎動物と冬

地球上のほとんどの場所で環境は季節的に変化する．そのため，生き物が生き延び，次世代を残すためには季節に生活史を合わせることが重要となる．温度は変温動物である無脊椎動物にとって直接生存に関わる重要な環境要因であり，高すぎても低すぎても不都合を起こす．例えば，成長の抑制，麻痺，繁殖の低下といった死亡以外にもさまざまな段階で個体に影響を与える．冬について考えてみよう．冬の低温を生き延びる方法の一つは，寒くならないところへ移動することである．オオカバマダラ *Danaus plexippus* というチョウの成虫は，冬を越すためにカナダや北アメリカからカリフォルニアやメキシコシコまでを移動し，渡りをする昆虫として有名である．しかし，このような長距離移動によって寒さから身を守ることができる昆虫は一部である．ではどうするか．もう一つの冬の生き延びる方法は，寒さに耐えるしくみをもつことである．

無脊椎動物の低温耐性は昆虫において盛んに研究されてきた（Denlinger and Lee, 2010；積木ら，2010）（泉の稿参照）．昆虫はその多くが熱帯を起源とする．熱帯では温度は一年中ほぼ一定で温かい．そのような熱帯に分布していた昆虫が，温帯，さらには冷温帯へと分布を拡大するにしたがい，低温になる季節である冬と直面することになった．昆虫が氷点下の気温を移動以外の方法で

連絡先
宇高　寛子
京都大学大学院理学研究科
〒606-8502　京都市左京区北白川追分町
Tel. 075-753-4097
e-mail：udaka@kingyo.zool.kyoto-u.ac.jp
１）京都大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Kyoto University, Oiwake, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto

耐えるしくみは，凍結への耐性を基準として大きく二つに分類することができる．一つは凍結後も生存可能な「凍結耐性型」，もうひとつは，凍結すると死亡するが，グリセロールなどの血中濃度を上昇させることで凝固点（過冷却点）を下げ，氷点下で生存する「凍結回避型」である．ただし，凍結耐性型であってもどのくらい長く凍結に耐えられるか，どの程度まで凍っても生きられるのかにも幅がある．また，凍結回避型にも凝固点をどこまで下げることができるかは種や季節，個体群などによってさまざまである．そのため，昆虫の低温耐性はより細かく分類することもできる（Sinclair, 1999）．また，凍結しても生存する昆虫がいる一方で，凝固点よりもずっと高い温度で死亡する昆虫も多い．したがって，その生物の低温耐性を論じるには過冷却点の高低のみではなく，その温度が生存などとどのような関係にあるのかを知らなくてはならない．

2．陸生軟体動物の低温耐性

陸に生息する貝を総称して陸貝と呼ぶ．この陸貝のうち殻を完全に退化もしくは，痕跡を体内にとどめている生き物を「ナメクジ」，発達した殻を持つ陸貝は「カタツムリ」の名称で呼ばれている．ナメクジは孵化したときから殻はなく，カタツムリはもっている．つまり，殻は成長とともに失ったり，得たりするものではない．カタツムリは暑さや寒さから，物理的に水分の多い軟体部を殻で守ることができる．また，軟体部を殻に収めたあと，開口部を粘液の蓋でふさげることも，低温や凍結から身を守ることに役立つ．そのため，カタツムリでは冬には過冷却点を下げて冬の低温を生き延びる「凍結回避型」が多く報告されている（Ansart and Vernon 2003）．

では，ナメクジ類はどうだろうか．ナメクジが殻を無くした利点として，殻を作るコストが不要になったこと，そして，湿度の保たれた狭い空間へ入ることができることが挙げられる．殻が無くても湿ったところに潜むことで，乾燥から身を守ることができるが，この隠れ場所の環境は冬には困ったことを引き起こす．植氷凍結である．ナメクジの体液にはさまざまな物質が含まれているので，凝固点降下により氷点下以下の低温でも容易に凍ることはない．しかし，湿った場所で越冬する場合は，体の周りの水は体液よりも高い温度で凍結し始める．そして，体外での氷形成は，氷が無い場合よりも高い温度で生物の体内での凍結を誘導する．これが植氷凍結である．昆虫においても，冬の気温が氷点下になる地域に分布する種のうち，湿った場所で越冬する種はこの植氷凍結を免れることは難しく，凍結回避型の戦略では冬に死んでしまう．そこで有効なのが，凍結しても死なないしくみ，凍結耐性をもつことである．

ナメクジ類が凍結に耐えるしくみはどのようなものなのだろうか．低温耐性研究が進んでいないため，残念ながら現在までわかっていることはごくわずかである．*Deroceras laeve* は −6℃ に 1 時間曝され体内の水分の 80％程度が凍結しても生存することができる，強い凍結耐性を持つナメクジである（Storey et al. 2007）．この *D. laeve* は 30 分間の凍結を経験するとグルコース量が約 100 倍に上昇することから，グルコースが凍結保護物質として機能していると推測される．グルコースの上昇は無酸素条件でも誘導されることから，凍結と無酸素に耐えることには共通したシステムがあることを示している．特に，*D. laeve* は他のナメクジ類よりも湿地帯を好むことが報告されている（Rollo and Shibata 1991）．このような生息地選好性が嫌気性の代謝と凍結耐性の獲得に関連しているのかもしれない．Storey et al.（2007）は *D. laeve* とともに，2 種のナメクジ類でも同様の実験を行っている．これらの 2 種は *D. laeve* よりも凍結に弱く，凍結によって誘導されるグルコース上昇もわずかであったことから，グルコースは凍結保護物質として機能し，凍結耐性の強弱と関連があると結論づけている．

凍結保護物質の探索は他のナメクジ類でも行われている．ヨーロッパに生息するナメクジ類の種数は日本よりも多い．Slotsbo et al.（2012）はスカンジナビア半島で広く見られる 3 種のナメクジ類で低温耐性を比較した．対象とした 3 種は，デンマークにおいて在来種の *Arion ater*，100 年ほど前に移入した外来種 *Arion rufus*，近年もっともよくみられる外来種 *Arion lusitanicus* と，異なる来歴をもつ．日本で一般的によく観察されるナメクジ（チャコウラナメクジ）の最大体重は 2 g 程度であるが，この 3 種は実験に使われた秋採集個体の平均が 4〜10 g であり，大型のナメクジ類である．−1℃ にナメクジを曝し，氷と接触させることで凍結を誘導した．2 日間，−1℃ で凍結した状態であっても 3 種ともほぼ 100％の生存率を示したことから，これらが凍結耐性を持つことがわかる．−1℃ に 2 日曝されることで，*A. rufus* と *A. lusitanicus* では血中のグルコース量が有意に上昇していたことから，これら 2 種ではグルコースが凍結防御物質として機能していると推測される．ただし，その濃度は他の凍結耐性を示す無脊椎動物や前出の *D. laeve* と比べて低い．また，−2℃ に曝した場合生存率は種によって異なり，*A. ater* は 0％，*A. rufus* が 75％，*A. lusitanicus* は 20％となったが，冷却する速度が速い場合は，どの種

でも生存率は0%であった．実施された実験では，在来種と外来種2種で低温耐性に大きな違いは見られなかったことから，著者らはこれらの3種がデンマークで成功できるかどうかに低温耐性はそれほど重要ではないのかもしれないと結論づけている．

昆虫においては，さまざまな糖や糖アルコールが凍結保護物質として機能していることがわかっている．一方，ナメクジ類では凍結保護物質と特定されている物質は現在のところグルコースだけであり，今後さらなる研究が必要である．

3．チャコウラナメクジの季節適応

3.1　チャコウラナメクジ

4，5月ごろ，雨上がりの壁をはう細長く茶色いナメクジを見たことはないだろうか．チャコウラナメクジ*Ambigolimax valentianus* は,イベリア半島を原産とする体長5 cm前後の中型のナメクジである（Waldén, 1961）．日本には1950年代に移入したと考えられており，現在国内の広い範囲でもっとも一般的にみられるナメクジになっている．変温動物で，しかも自力での移動能力が乏しいナメクジが移入から50年程度で全国に分布を拡大したことになる．同じく第二次世界大戦後移入したアメリカシロヒトリというヒトリガ科の昆虫がいる．本種は樹木への甚大な被害が予想されたことから，その生態や分布がつぶさに研究された．1945年に移入が確認され（Masaki, 1975），徐々に分布を拡大していったが，移入から約70年たった現在でもその北限は函館市周辺にとどまっている（三上ら，2018）．

チャコウラナメクジはいつの間にか，ナメクジといえば茶色い細い，というほど日本中でなじみのある生き物となった．その一方で，防除以外の面で研究されることはなく，いつ繁殖しているのか，どのようなステージで越冬をしているのかということさえ，わかっていなかった．

3.2　大阪における生活史の解明

チャコウラナメクジの生活史を明らかにするため，まず大阪市内にある大阪市立大学（現・大阪公立大学）構内で野外個体の定期採集を行った．毎月，30匹のチャコウラナメクジを採集し，体重や両性腺の発達度合いを調べた．ナメクジは活動中と休息時では体の長さは変化するため，長さを統一的に測定することは困難である．そのため，体重を測定した．ナメクジ類のほとんどは雌雄同体で「両性腺」という器官で，精子と卵母細胞の両方を産出する．両性腺で作られたそれぞれの生殖細胞は，別々の管を通り体外へと排出される．雌雄同体であるが，自家受精の度合いは種によって異なっており，交尾により他個体と精子交換が必要な種も多い（South, 1992）．ナメクジ類における性成熟の季節変化を調べた先行研究では，陰茎発達の有無（Kano et al. 2001），両性腺やタンパク腺（卵の外膜を作る）の重量（Sokolove & McCrone, 1978）が主な性成熟の指標として用いられてきた．より正確を期すため両性腺の重量測定とともに，パラフィン切片を作製し，両性腺内の精子形成段階や卵母細胞の大きさを調べた．その結果，大阪で梅雨や夏にあたる5〜9月には性成熟していないことがわかった．性成熟個体は10月以降に見られるようになった（図1）．

両性腺の体重に占める割合は11月をピークに徐々に減少した．この変化は，交尾や産卵により両性腺内の精子や卵母細胞が排出された，つまり交尾や産卵がこの時期に起こっていることを示すものだと考えられた．しかし，昆虫のなかには，秋までに交尾をするが，雌が産卵をするのは春になってから，というものもいる．そのため，性成熟をしている時期を特定したのち，さらに産卵と孵化の時期を特定する実験を行った．野外個体を9月と10月に採集し，野外に置いた容器で飼育し，毎日産卵数を調べた．卵は別の容器で保管し，これらも親個体と同じ場所に置き，孵化までの日数を調べた．これらの実験結果から，チャコウラナメクジは，秋に性成熟し，気温がもっとも下がる2月はやや少なくなるものの秋から春にかけて産卵していること，孵化は冬のはじめから春にかけて起こることが明らかになった（図2）．

温帯に生息する変温動物のうち，低温になる秋に繁殖を開始する生き物は珍しい．冬に繁殖を避けることは他のナメクジ類でも見られる（Rollo, 1983; Cook and Radford, 1988; Grimm, 2001）．通常は活動が抑制される季節に繁殖をしているチャコウラナメクジは，どれほどの低温耐性を備えているのだろうか．

4．チャコウラナメクジの低温耐性

4.1　低温耐性の測定方法

温度耐性にはさまざまな評価方法が存在する．低温耐性の研究が盛んな昆虫で見た場合，最も一般的なものは特定の温度を経験させた後，一定時間後に生きているかどうかという生死を基準とした評価である．生死以外に，死亡しない程度の温度を用いて，低温で麻痺するまで，もしくは麻痺させたのちに温度を上げ麻痺から回復するまでの時間を温度耐性の指標とすることもある．低

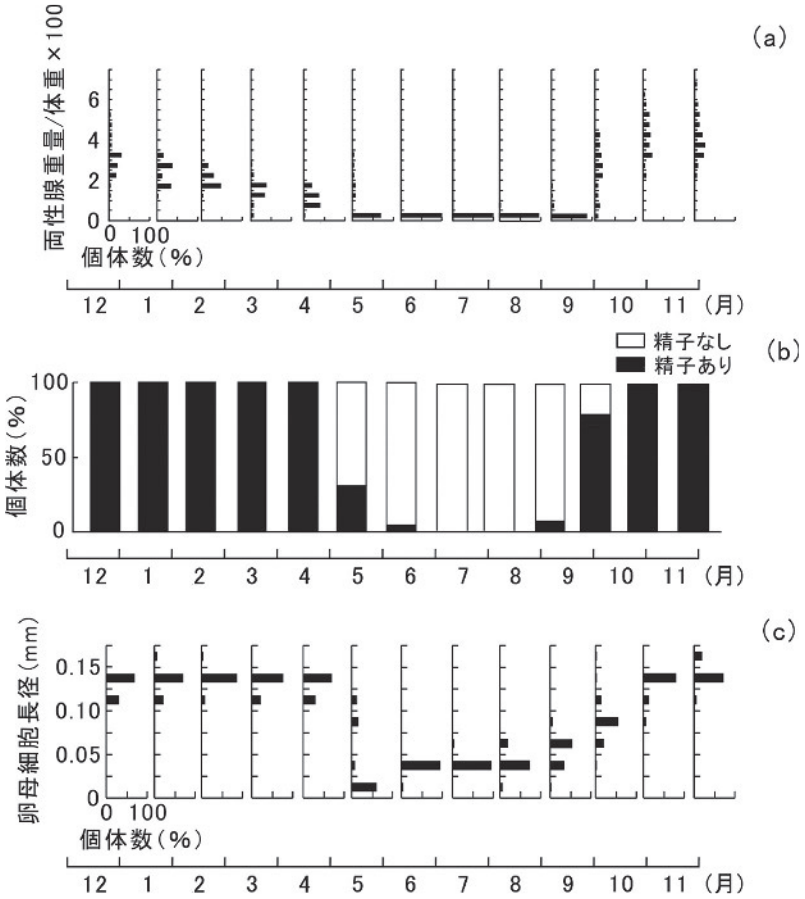


図 1：大阪市におけるチャコウラナメクジの性成熟の季節変化
（a）体重に占める両性腺重量の割合，（b）両性腺内に精子を持つ個体の割合，（c）両性腺内の卵母細胞の発達．（Udaka et al., 2007 を改変）．

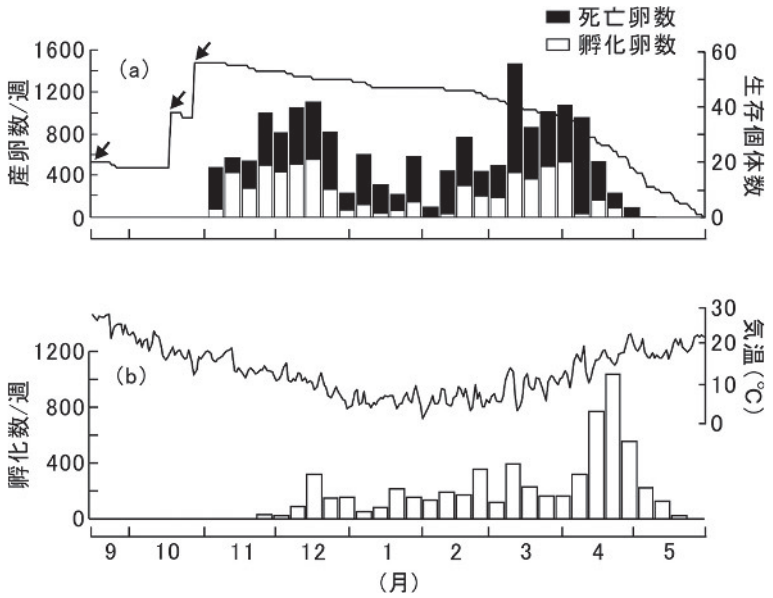


図 2：大阪における産卵数と孵化数の季節変化．（a）親世代の生存曲線（線グラフ，矢印は野外個体を採集した日を示す）と 1 週間ごとの産卵数（棒グラフ）．（b）実験時の大阪市の日平均気温と 1 週間ごとの孵化数．（Udaka et al., 2007 を改変）．

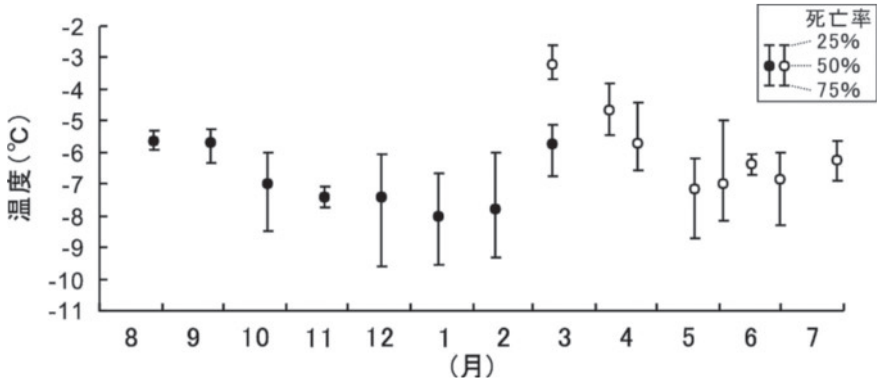


図 3：大阪における低温耐性の季節変化．黒丸は親世代，白丸は子世代での結果を示す．（Udaka et al., 2008 を改変）．

温により麻痺した個体は，加温すると再び動きだす．死亡とは異なり，麻痺は可逆的な反応であるため，例えば麻痺からの回復が早い（耐性が高い）か，遅い（耐性が低い）かによって人為的に温度耐性による選択を行い，温度耐性が異なるグループを作ることで，耐性の強弱がどのようなしくみによって引き起こされるのかを探ることができる．最も適切な評価方法は，低温が繁殖におよぼす影響を調べることだろう．例え，低温を経験した後一定時間は生存したとしても，まったく次の世代を作ることができなければその低温耐性は適応的な意味がほぼ無いからである．ただし，結果を得るための労力が多大であるためか，実際にここまで調べている研究は少ない．

チャコウラナメクジの低温耐性を調べる場合，どのような指標を採用することが適切なのだろうか．ナメクジは，昆虫のように常に動き回っているわけでもなく，また麻痺してもひっくり返ることもない．そのため，低温で麻痺しているのか，それとも単に休息しているのかを判断することが難しい．また，採集する季節によっては未成熟個体であり，産卵数やその孵化数といった繁殖による評価にはかなり困難であった．そこで，生存・死亡を指標としてチャコウラナメクジの低温耐性について調べることとした．

4.2　低温耐性の季節変化

生活史の解明と同様に，約 4 週間ごとに大阪市立大学構内でチャコウラナメクジを採集した．採集後，体重を測定し 7–10 個体ずつ体重の分布が等しくなるように分け，50 ml のプラスチックチューブに入れた．試験温度に設定したグリセロールバスにチューブごと入れ，1 時間後に取り出した．低温にさらしたナメクジは明期 12 時間：暗期 12 時間・20℃に設定したインキュベータに維持し，24 時間後に生死判定を行った．25，50，75％の致死率（$Lt_{25, 50, 75}$）が計算できるまで 1℃きざみで試験温度を変更し，実験を実施した．各試験温度には 19〜40 個体を用いた．

2003 年 8 月に実験を開始した．11 月には孵化したての子世代が見られるが，十分な個体数を集めることが困難なため，8 月から 2 月は親世代のみを，3 月は親世代と子世代の両方を，そして，4 月から 6 月は子世代のみで耐性を測定した．繁殖時期が終わりに近づくと親世代のチャコウラナメクジは小さくなり，逆に子世代のうち早くに孵化した個体は成長が進む．そのため，体サイズでは両世代を区別することは困難であるが，両者は体色で見わけることが可能である．

1 年にわたり調べた結果，チャコウラナメクジの低温耐性について以下のことがわかった．半数が死亡する温度（Lt_{50}）を見るとチャコウラナメクジは夏には致死温度は高く，秋から冬にかけて徐々に低くなっていった（図 3）．なかでも 1 月と 2 月の Lt_{50} は −8℃，−7.8℃と最も低くなった．春には世代に関係なくもっとも低温に弱くなった．子世代では 3 月から 5 月は徐々に低温耐性が高まった．これらの野外個体での結果から，チャコウラナメクジの低温耐性は季節的に変化することが明らかになった．では，このような変化は，直接気温の上がり下がりに反応して引き起こされているのだろうか？

4.3　光周性

低温耐性の上昇を誘導する環境要因の一つは温度である．長期間（数日程度），死なない程度の低温にさらされることで，さらに低い温度へ強くなる「順化」という現象がある．昆虫に限らずさまざまな生き物で見られる現象であるものの，順化の具体的なしくみは低温耐性の研究がさかんな昆虫でも解明が進んでいない．温度以外に低温耐性の高低に影響する環境要因として，日長（1 日のうちの明るい時間の長さ）が挙げられる．

24 時間で地球は 1 回転し，太陽の側にいるときは昼，

太陽と反対側になると夜となる．そして，地球は地軸を約 23° 傾けた状態で太陽の周りを 1 年かけて回るため，昼の長さは日々変化する．このように明るい，暗いの時間は天体の運行によって決まっているため，同じ地点では年による違いはなく，規則的に変化する．また，温度の変化に先立って，日長は変化することから，変動する季節を予測するのに有効なシグナルとなる．日の長さに反応する性質を「光周性」といい，光周性は昆虫をはじめとする無脊椎動物だけでなく，鳥類，一部の哺乳類でも持つことがわかっている．温帯，冷温帯に生息する昆虫のなかには，休眠という特殊な生理状態で冬を越す．休眠は活動には不適切な季節が始まる前に誘導される．昆虫全体をみると，休眠は卵，幼虫，蛹，成虫のどの発達段階でも見られるが，どの段階で休眠に入るかは種によって決まっている．そして，この休眠の誘導に，光周性を示す昆虫が多数知られている（Denlinger, 2022）．休眠をもつ昆虫種において，光周性と低温耐性の関係はやや複雑である．光周性により休眠に入ること自体が低温耐性を上昇させる場合もあるためである．

陸生軟体動物と日長の関係は，昆虫ほど注目されてこなかったが，エスカルゴとして食用になっているカタツムリ *Cornu aspersa* やマダラコウラナメクジ *Limax maximus* において光周期が成長や性成熟におよぼす影響が調べられてきた．しかし，光周性を持つことが示された種が少なく（Numata and Udaka, 2010），低温耐性に関する研究も少ないため，陸生軟体動物の低温耐性に光周期や他の環境要因が関わっているのか，という知見はかなり少ない．著者らは大阪のチャコウラナメクジの性成熟と成長が短い日長によって両性腺発達が誘導されることを飼育実験によって明らかにしていた（Udaka and Numata, 2008）．このことからチャコウラナメクジが日長を感受するしくみを持つと言える．では，光周期は性成熟や成長だけでなく，温度耐性にもかかわっているのだろうか？

4.4　低温耐性に関与する環境要因

チャコウラナメクジの低温耐性が季節変化することを先に示したが，*Deroceras reticulatum* では過冷却点が季節によって異なることがわかっているものの，その変化がどのような環境要因によって誘導されているのかはわかっていない（Storey et al., 2007）．チャコウラナメクジの低温耐性の上昇に温度順化や光周期が関与するのかを飼育個体によって調べた．研究室で得た卵を孵化させた．孵化後 48 時間以内の幼体を，明期 16 時間：暗期 8 時間（以下，長日条件）もしくは，明期 12 時間：暗期 12 時間（以下，短日条件）の 2 つの光周期条件（温度はいずれも 20℃）で 45 日間飼育した．45 日目に光周期条件はかえず，温度だけ 15℃，20℃，25℃の 3 つのいずれかにし，さらに 15 日飼育した．飼育 60 日目に，低温耐性を測定した．測定方法は前述の野外個体と同様に，1 時間のさまざまな低温にさらし，24 時間後の生死を調べた．その結果を図 4 に示す．野外個体と同様に，$Lt_{25,\ 50,\ 75}$ を算出する予定であったが，一部生存率が逆転している温度条件があったこと，短日条件で飼育した個体のうち，15℃で 15 日飼育した個体は－10℃に 1 時間さらされても死亡率が 75％を越えなかったが，当時研究室の設備では－10℃が設定できる最低温度だったため，さらに低い温度での実験を行うことができなかった．そのため，野外個体とは異なるデータ表記となった．

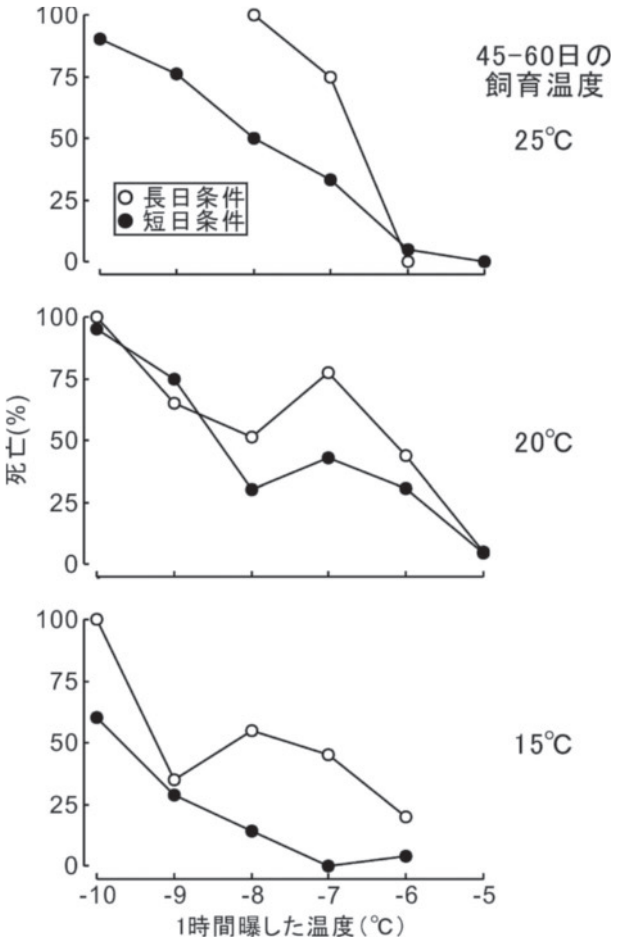


図 4：低温耐性におよぼす光周期と温度の影響．（Udaka et al., 2008 を改変）．

2 つの光周期，3 つの温度条件の間で耐性を比較すると，どの飼育温度であっても短日条件で飼育した個体のほうが，長日条件で飼育した個体よりも強い低温耐性を示した．続いて，短日条件・長日条件それぞれで，3 つの順化温度条件間で比較すると，すべてではないが多くの

試験温度において，短日・長日にかかわらず 20℃よりも 15℃で飼育された個体のほうが低温に強かった．これらのことから，チャコウラナメクジの低温耐性は低温への順化だけでなく短い日長によっても促進されることがわかった．これらの実験により，チャコウラナメクジの低温耐性が季節的に変化し，その変化には温度だけでなく日長も関与していることが明らかになった．しかし，他の多くのナメクジ類と同様，チャコウラナメクジにおける低温耐性の具体的なメカニズムの解明には未だ至っていない．

4.5　卵の低温耐性

上記の実験では，60 日飼育し成長の進んだチャコウラナメクジで行ったが，晩秋と冬に産卵することから，卵の状態で越冬する個体も多い．卵はどの程度の低温耐性をもっているのだろうか．飼育個体から得られた卵を 5〜25℃のさまざまな温度に維持し，孵化までの日数と孵化率を調べた（図 5）．発生は温度依存的に進むので，温度が低くなるほど孵化までの日数は長くなり，5℃では孵化まで約 120 日かかったが孵化率は約 65％であった．一方，25℃ではすべての卵が死亡した．この実験から，チャコウラナメクジの卵にとって適切な温度は 15〜20℃であり，低温よりも高温のほうが致死的であることがわかる．5℃よりも低温では実験を行っていないが，図 2（b）に示すように大阪市の冬を生き延びるには十分な低温耐性を持っていると言える．

4.6　札幌市のチャコウラナメクジ

ここまで大阪市での研究について紹介してきたが，チャコウラナメクジは北海道にも生息している．−7℃程度の低温でも生存できる低温耐性を持つため，北海道でも生きられるのは不思議ではないかもしれない．しかし，北海道と大阪では大きく気候が異なっている．北海道のほうが夏の気温は低く，秋は早く到来する．そして，冬は長く続く．大阪とおなじタイミングで性成熟した場合，成熟後の産卵期間は極めて短くなり繁殖の機会が少なくなる．札幌の気候にあった生活史を持っている，つまりチャコウラナメクジの生活史には地理的変異があると予想された．そこで札幌市にある北海道大学構内で，定期的な採集を行い，成熟時期について調べた．その結果，札幌市の個体は大阪市よりも 2 か月ほど早く性成熟を開始することがわかった（Udaka and Numata, 2010）．大阪個体と同様に卵から成体までさまざまなステージで冬を越す．札幌と大阪で低温耐性に違いがあるのかは不明であるが，札幌市の冬は積雪があり，チャコウラナメクジは雪と地面の間にいる．そのため，気温は氷点下になっても，雪というバッファーがあるためその下の地面は約 0℃で保たれナメクジが氷点下の温度に曝される可能性は低い．そのため，大阪個体と札幌個体で低温耐性に大きな地理的な違いは見られないかもしれない．

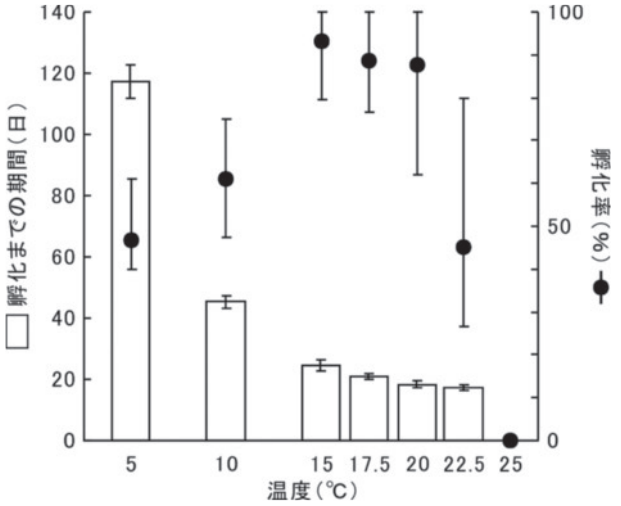


図 5：温度が卵の孵化率の孵化日数におよぼす影響．（Udaka et al., 2007 を改変）．

大阪と札幌の双方で，チャコウラナメクジはさまざまな発達段階で越冬するが，より寒さが厳しい地域では，越冬ステージが限定される．例えば，ロシア連邦マガダンに生息する 4 種のナメクジ類では，種によって卵または成体のいずれかで越冬する．越冬ステージはそれぞれの種の低温耐性および，年間を通じて温度が低く生育に時間がかかることと関連しているのだろう（Berman et al., 2011）．

5．さいごに

ナメクジ類には強弱はあるものの，凍結耐性を持つものがいくつか報告されており，それは湿った場所で越冬することと密接に関係しているのだろう．凍結を生き延びるしくみは，昆虫でもまだ解明が進んでいない分野である．また，ナメクジ類と昆虫は同じ変温動物といっても体のつくりも大きく異なる．さらに，冬の低温はナメクジ類には昆虫ほどの大きな分布拡大の障壁とはならないのかもしれない．ナメクジ類の低温耐性を研究することで，無脊椎動物の低温耐性のしくみの多様さや分布域の拡大と温度の関係について，新しい知見が得られることが期待される．

参考文献

Ansart, A., & Vernon, P. (2003) Cold hardiness in molluscs. *Acta Oecol*, **24**, 95–102. doi: 10.1016/S1146-609X(03)00045-6

Berman, D. I., Meshcheryakova, E. N. & Leirikh, A. N. (2011) Cold hardiness, adaptive strategies, and invasion of slugs of the genus *Deroceras* (Gastropoda, Pulmonata) in northeastern Asia. *Biol Bull Russ Acad Sci*, **38**, 765–778. doi: 10.1134/S1062359011080012

Chown, S. L., Chown, S., & Nicolson, S. (2004) *Insect physiological ecology: mechanisms and patterns*. Oxford University Press.

Cook, A., & Radford, D. J. (1988) The comparative ecology of four sympatric limacid slug species in Northern Ireland. *Malacologia*, **28**, 131–146.

Denlinger, D, L. (2022) *Insect Diapause*. Cambridge University Press, Cambridge. doi: 10.1017/9781108609364

Denlinger, D. L., & Lee Jr, R. E. (Eds.). (2010) *Low temperature biology of insects*. Cambridge University Press.

Grimm, B. (2001) Life cycle and population density of the pest slug *Arion lusitanicus* Mabille (Mollusca: Pulmonata) on grassland. *Malacologia*, **43**, 25–32.

Kano. Y., Fukuda. H., Yoshizaki. H., Saito. M., Hosaka. K. I., et al. (2001) Distribution and seasonal maturation of the alien slug *Lehmannia valentiana* (Gastropoda: Pulmonata: Limacidae) in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J Malacozool Assoc Yamaguchi*, **8**: 1–13

三上修，岡本瑞貴，矢吹和也，＆中川優奈．（2018）函館市におけるアメリカシロヒトリの発生状況：街路樹被害状況と防除のため基礎的研究．北海道教育大学紀要．**69**（1）．49–59.

Masaki, S., Umeya, K., Sekiguchi, Y., & Kawasaki, R. I. (1968) Biology of *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan: III. Photoperiodic induction of diapause in relation to the seasonal life cycle. *Appl Entomol Zool,* **3** (2), 55–66. doi: 10.1303/aez.3.55

Numata, H., & Udaka, H. (2010) Photoperiodism in Mollusks. *Photoperiodism: the biological calendar*. (R. j. Nelson, D. L. Denlinger, & D. E. Somers, Eds.). Oxford University Press, UK, 173–192.

Rollo, C. D. (1983) Consequences of competition on the reproduction and mortality of three species of terrestrial slugs. *Res Popul Ecol*, **25**, 20–43.

Rollo, C. D., & Shibata, D. M. (1991) Resilience, robustness, and plasticity in a terrestrial slug, with particular reference to food quality. *Can J Zool*, **69**(4), 978–987.

Sinclair, B. J. (1999) Insect cold tolerance: How many kinds of frozen? *Eur J Entomol,* **96**, 157–164.

Slotsbo, S., Hansen, L. M., Jordaens, K., Backeljau, T., Malmendal, A., Nielsen, N. C., & Holmstrup, M. (2012) Cold tolerance and freeze-induced glucose accumulation in three terrestrial slugs. *Comp Biochem Physiol*, **161**(4), 443–449. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.01.002

Sokolove, P. G., & McCrone, E. J. (1978) Reproductive maturation in the slug, *Limax maximus*, and the effects of artificial photoperiod. *J Comp Physiol*, **125**: 317–325.

South, A. (1992) *Terrestrial Slugs*. Biology, Ecology and Control. Chapman & Hall, London.

Storey, K. B., J. M. Storey & Churchill, T. A. (2007) Freezing and anoxia tolerance of slug: a metabolic perspective. *J Comp Physiol B*, **177**, 833–840. doi: 10.1007/s00360-007-0179-y

Storey, K. B., Storey, J. M., & Churchill, T. A. (2007) Freezing and anoxia tolerance of slugs: a metabolic perspective. *J Comp Physiol B*, **177**(8), 833–840. doi: 10.1007/s00360-007-0179-y

積木久明・田中一裕・後藤三千代編（2010）昆虫の低温耐性―その仕組みと調べ方．岡山大学出版会，岡山.

Udaka, H., M. Mori, S. G. Goto & Numata, H. (2007) Seasonal reproductive cycle in relation to tolerance to high temperatures in the terrestrial slug, *Lehmannia valentiana*. *Invertebr Biol*, **126**, 154–162. doi: 10.1111/j.1744-7410.2007.00085.x

Udaka, H., S. G. Goto & Numata, H. (2008) Effects of photoperiod and acclimation temperature on heat and cold tolerance in the terrestrial slug, *Lehmannia valentiana* (Pulmonata: Limacidae). *Appl Entomol Zool*, **43**(4), 547–551.

Udaka, H., & Numata, H. (2008) Short-day and low-temperature conditions promote reproductive maturation in the terrestrial slug, *Lehmannia valentiana*. *Comp Biochem Phys A*, **150**(1), 80–83. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.03.007

Udaka, H., & Numata, H. (2010) Comparison of the life cycle and photoperiodic response between northern and southern populations of the terrestrial slug *Lehmannia valentiana* in Japan. *Zool Sci*, **27**(9), 735–739. doi: 10.2108/zsj.27.735

Waldén, H. W. (1961) On the variation, nomenclature, distribution and taxonomical position of *Limax* (*Lehmannia*) *valentianus* Férussac (Gastropoda, Pulmonata). *Ark Zool*, **15**, 71–95.

低温科学 81 （2023） 19–26
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 19

線虫 *C. elegans* の低温耐性・馴化における全身周回性の神経回路による腸の脂肪蓄積の制御

山城　芹奈[1)]，寺西　宏顕[2)]，本村　晴佳[3)]，太田　茜[4)]，久原　篤[5)]

2022 年 9 月 26 日受付，2023 年 1 月 10 日受理

動物の寒冷適応戦略の解析モデルとして使われている線虫 *C. elegans* の低温応答・低温耐性に関する最新の研究を紹介する．*C. elegans* は，そのエレガントな姿に引けを取らないほど古典的な遺伝学に力強い長所があり，それに加えて，最新の全脳イメージングや，個体が持つ 302 個の全ての神経細胞の単一ニューロン トランスクリプトームデータベースなど，最先端の学術ソースを兼ね備える究極のモデル動物である．本稿では，*C. elegans* が示す低温耐性と温度馴化における，温度受容から低温耐性までの分子と組織のネットワーク機構に関する最新の知見を概説する．シンプルな動物の低温耐性から次々と見つかってきた，予期せぬ分子と組織を介した低温耐性の制御機構には，分野外の読者も興味を惹かれるであろう．

Regulation of intestinal fat accumulation by whole-body circular neural circuits during cold tolerance and acclimation in nematode *C. elegans*

Serina Yamashiro[1], Hiroaki Teranishi[2], Haruka Motomura[3], Akane Ohta[4] and Atsushi Kuhara[5]

As a model for analyzing cold tolerance and acclimation strategies in animals, we introduce the latest research on cold response and cold tolerance in the nematode *C. elegans*. *C. elegans* is one of the ultimate model animals, combining the classic strengths of powerful genetics that are second to none in its elegant appearance, with the latest scientific resources, including whole brain imaging and a transcriptome database of all 302 single neurons in the animal. This paper outlines the recent study of the molecular and tissue networks underlying the cold tolerance and temperature acclimation of *C. elegans*. Even those the person outside the field will be fascinated by the unexpected molecular and tissue-mediated regulatory mechanisms of cold tolerance that have been discovered in a simple model.

キーワード：線虫，低温耐性，温度馴化，神経回路
C. elegans, cold tolerance, temperature acclimation, neural circuit

連絡先
久原　篤，太田　茜
甲南大学理工学部生物学科
〒658-8501　兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1
Tel. 078-435-2539
e-mail：atsushi_kuhara@me.com（久原），o_akaneiro@me.com（太田）
1－3）甲南大学大学院自然科学研究科，統合ニューロバイオロジー研究所
Graduate School of Natural Science, Konan University; Institute for Integrative Neurobiology. 1–3: These authors are equally contributed
4）統合ニューロバイオロジー研究所，甲南大学理工学部生物学科
Institute for Integrative Neurobiology; Faculty of Science and Engineering, Konan University
5）甲南大学大学院自然科学研究科，統合ニューロバイオロジー研究所，甲南大学理工学部生物学科，PRIME, AMED
Graduate School of Natural Science, Konan University; Institute for Integrative Neurobiology; Faculty of Science and Engineering, Konan University; PRIME, AMED

1．はじめに

環境情報の中でも温度は常に存在するため，温度に対する応答や記憶，そして耐性の分子機構の解明は現代社会の重要な課題である．動物は環境中の温度に対して様々な応答をすることで，時々刻々と変化する温度環境で生存や繁栄することができる．一方で，動物の温度への応答や耐性の分子や組織のメカニズムには未知の点が残されている．本稿では，シンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* をモデル実験系とした，低温耐性や温度馴化に関わる分子と組織のネットワークについて，最新の知見をもとに概説する．

2．線虫 *C. elegans* とその神経系

線虫 *C. elegans* は，個体，細胞ネットワーク，個々の細胞，遺伝子（分子）という 4 つの階層レベルにおいて，生命理学の基本原理の解析に適したモデル動物である．*C. elegans* は，体長が約 1 mm の土壌中に生育する非寄生性の線虫で，20℃で約 3.5 日間で卵から成虫になるため生活環は短い．多くの個体が雌雄同体で自家受精により増殖するため，子のゲノムは親のクローンであることが多く，野生株に限らず変異体の系統維持も容易である．さらに，0.1%の頻度で自然に出現する雄を利用して雌雄同体と交配することが可能であり，雄の発生確率もヒートショックなどにより高めることができる．1960 年代から遺伝学解析の実験材料として用いられてきたため，変異体系統のストックバンクも充実しており，遺伝学的解析に適している（Brenner, 1974）．遺伝子導入には，特別なベクターを必要とせず，成虫の生殖巣に特定の遺伝子の ORF を含む PCR フラグメントを注入するだけで，その遺伝子が発現するトランスジェニック系統を確立することができる．多くの場合は，およそ 1 週間あれば，遺伝子導入からトランスジェニック系統の確立までを行うことが可能である．

C. elegans の体は透明で，雌雄同体は 959 個の体細胞で構成されている．それらの体細胞のうち，302 個が神経細胞（ニューロン）である．*C. elegans* の全身を頭部から尾部までを約 3 万枚の切片にし，電子顕微鏡で写真を撮影し，コンピューター内で再構築することで，全神経細胞間の約 7000 個の化学シナプス及びギャップ結合が明らかにされている（White et al., 1986）．*C. elegans* の神経細胞は雌雄同体では 302 個，雄では 385 個であり，雌雄同体が持っているニューロンのほとんどを雄も持っている．一方で，各神経細胞のシナプスやギャップ結合の接続数やパターンを調べると雄と雌雄同体で，最大で約 30%の違いがある（Cook et al., 2019）．これが雌雄同体と雄の神経情報処理の違いを生んでいる．

C. elegans のゲノムサイズはモデル動物の中でも特に小さい約 100 Mb であり，1998 年に全塩基配列が決定されている（*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998）．ゲノム解析の結果から，全遺伝子の約 36%がヒトの遺伝子と類似した遺伝子であったため，線虫の遺伝学的解析から見つかってきた遺伝子をヒトの遺伝子解析に対応付け解析が行われることも多い．特に，線虫からヒトまで高度に保存されているが機能が未知の遺伝子なども線虫の表現型を指標に見つかってきているため，発展が期待されている（Miyara et al., 2011; Nishio et al., 2012）．雌雄同体の成虫がもつ 302 個のニューロンで特異的に発現している遺伝子のプロモーター DNA 配列に，緑色蛍光タンパク質 GFP を融合し，線虫に導入することで，特定の細胞がマークされた系統が多数作成されている．最近では，特定の細胞で蛍光タンパク質を発現させるプロモーターを多数組み合わせて，4 色の蛍光タンパク質を発現させ，302 個の神経細胞ひとつひとつをマルチカラーと位置で同定できる遺伝子導入系統が作成され，NeuroPAL（ニューロパル）系統と呼ばれている（Yemini et al., 2021）．この NeuroPAL 系統では，GFP 以外の蛍光タンパク質で全細胞を色分けしていることから，発現細胞が不明な遺伝子の GFP 融合タンパク質を NeuroPAL の系統に発現させることで，GFP とマルチカラーで色づけられた神経細胞のパターンの重なりから，目的の遺伝子がどの細胞で発現しているかを容易に同定することができようになった．光遺伝学による神経活動の測定や操作も透明な体をもつ *C. elegans* において，極めて有用なツールである（Kuhara et al., 2011）．

NeuroPAL 系統から細胞を分離させ，それらの色分けを指標にセルソーターで仕分けることで *C. elegans* の 302 個のニューロンの大部分を個別に単離することに成功している（Taylor et al., 2021）．それらの個々のニューロン群から単離された mRNA を使い 1 細胞トランスクリプトーム解析が行われ，302 の神経細胞のほぼすべてについて，各単一ニューロンで発現する遺伝子の発現レベルが定量化され，CenGEN（C. elegans Neuronal Gene Expression Network）と呼ばれるデータベースが作製された（Taylor et al., 2021）．CenGEN は，インターネット上の WEB アプリケーションとして公開されているため（https://cengen.shinyapps.io/CengenApp/），調べたい遺伝子が発現する神経細胞のリストと，特定の神経細胞での遺伝子発現量のリストを容易に入手することが可能

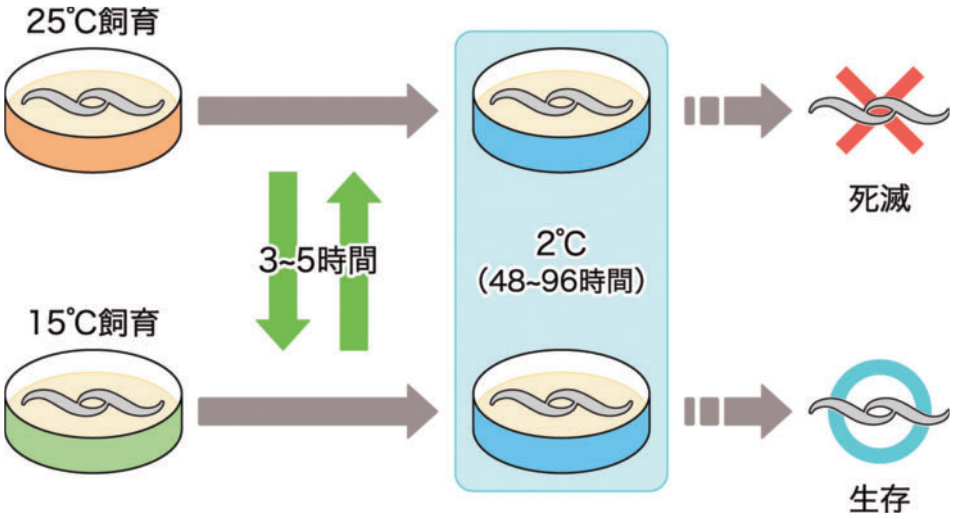


図 1：線虫 *C. elegans* の低温耐性・温度馴化
線虫 *C. elegans* の低温耐性と温度馴化現象．低温耐性とは 25℃で飼育された野生株はその後 2℃に置かれると死滅するが，15℃で飼育された個体は 2℃に置かれても生存できる現象である．温度馴化とは 15℃で飼育された個体は 3〜5 時間 25℃に置かれた後，2℃に置かれると死滅するようになる．逆に 25℃で飼育された個体は 3〜5 時間 15℃に置かれた後，2℃に置かれても生存できるようになる現象である．

となっている．

3．*C. elegans* の低温耐性

生物の低温耐性とは一般的に，通常の生育温度より低温の環境でも生存できる性質のことを指す．生物の低温環境に対する耐性（低温耐性）の研究は，古くから植物や昆虫で行われてきた．植物にも昆虫にも共通してみられる低温に対する耐性機構に，生体膜の不飽和脂肪酸含有量が多いこと（村上らの稿参照）や，細胞内にアミノ酸などの凍結しにくい物質をもつことなどがあげられる（泉，宇高の稿参照）．*C. elegans* の環境の温度変化への応答として温度走性や，高温環境や低温環境に対する耐性がある（Kuhara and Ohta, 2018; Ohnishi et al., 2019; Ohta and Kuhara, 2013; Okahata et al., 2022; Takeishi et al., 2020）．そのうち，温度走性と高温耐性である耐性幼虫（ダワー）の研究は 1970 年代から研究が行われており，長い歴史がある．*C. elegans* の生育温度は約 13〜27℃で，それよりも高温になると大部分の個体がダワー耐性幼虫になる．耐性幼虫では体は細く，活動が鈍くなりエネルギー状態も低くなる．その一方で，*C. elegans* の低温耐性と温度馴化の主要な研究は 2010 年代以降のものであり，比較的新しい研究分野である（Okahata et al., 2022; Takeishi et al., 2020）．*C. elegans* の低温耐性とは，例えば，15℃で飼育した個体は 2℃で 48 時間の低温にも耐えられるが，25℃で飼育した個体は低温に耐えられず，死滅してしまう現象である（図 1）（Ohta et al., 2014; Ujisawa et al., 2014）．さらに，25℃で飼育した個体を 3〜5 時間 15℃に置くことで，2℃で生存できるようになる低温馴化現象が見つかってきた（Okahata et al., 2016; Okahata et al., 2019）．逆に，15℃で飼育した個体を 3〜5 時間 25℃に置くことで，2℃で死滅する温度馴化現象も見つかった（Motomura et al., 2022）．

これまでに *C. elegans* の低温耐性が，神経系を含む複数の組織による共同的な制御によって成立していることが少しずつ分かってきている．低温耐性において，環境の温度情報は少なくとも頭部の 3 対の温度受容ニューロンである ASJ，ADL と ASG で受容される（図 2）（Kage-Nakadai et al., 2016; Ohta et al., 2014; Takagaki et al., 2020; Ujisawa et al., 2018）．これらの温度受容ニューロンは，頭部の咽頭筋付近に細胞体があり，細胞体から頭部方向に樹状突起が伸長し，その先端には感覚繊毛構造をもつ．ASJ，ADL と ASG は温度受容ニューロンであるが，元々は，ASJ は光と化学物質を受容する感覚ニューロンとして，ADL と ASG は化学受容ニューロンとして知られていた．

温度受容ニューロン ASJ における温度受容体は未同定であるが，ASJ で受容された温度情報は，ASJ の感覚繊毛に局在している 3 種類の三量体 G タンパク質 α サブユニット（GPA-3，GPA-13，GOA-1）を介して伝達され，それらが cGMP 合成酵素であるグアニリル酸シクラーゼ ODR-1 を活性化し，ASJ 内の cGMP 濃度が上昇

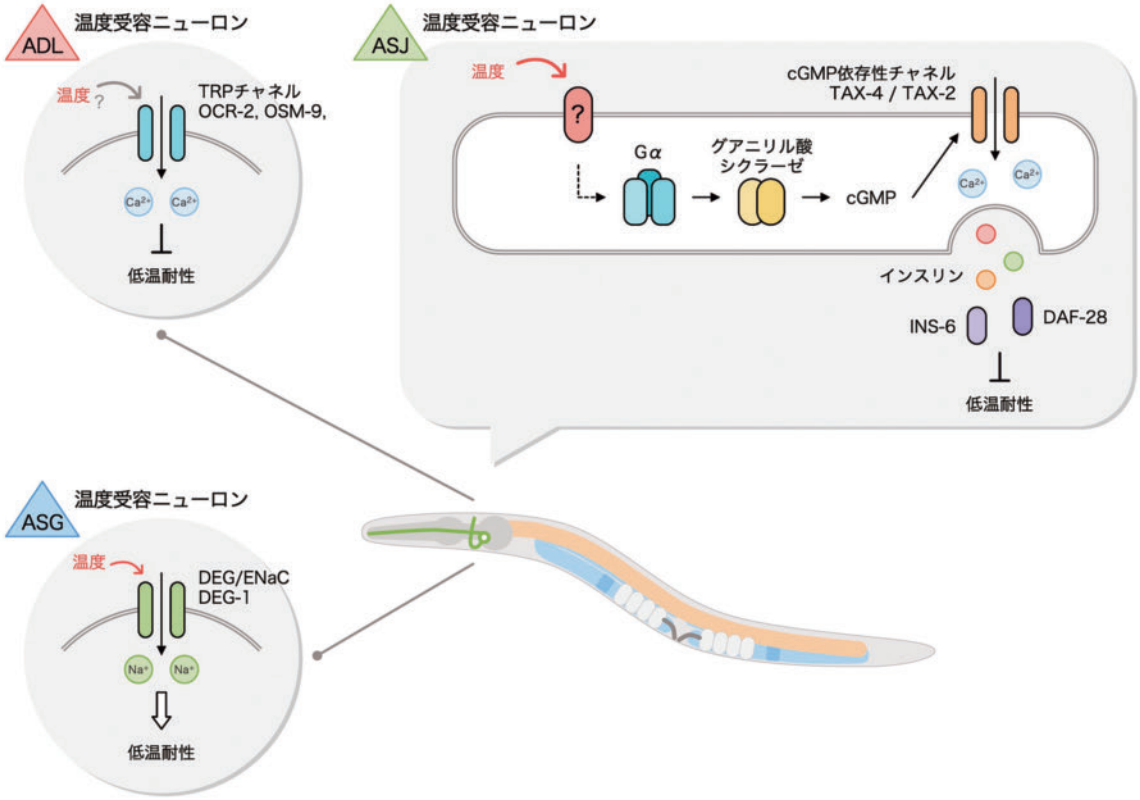


図 2：低温耐性に関わる温度受容ニューロン
頭部に存在する 3 対の温度受容ニューロン ASJ，ADL そして ASG が低温耐性に関わる．ASJ では，未同定の温度受容体で受容された温度情報が三量体 G タンパク質 α サブユニット（Gα）を通して伝達され，グアニリル酸シクラーゼを活性化することで，cGMP 依存性チャネル（TAX-4/TAX-2）を開口させる．これにより ASJ が活性化され，ASJ のシナプスからインスリンが分泌されることで低温耐性を負に制御する．ADL では，温度感受性 TPR チャネルである OSM-9 と OCR-2 が温度受容体として機能し，低温耐性を負に制御する．ASG ではメカノ受容体 DEG/ENaC である DEG-1 が温度受容体として働き，低温耐性を正に制御する．

すると cGMP 依存性チャネル TAX-4/TAX-2 を開口させることで，細胞内に陽イオンを流入させ，ASJ が活性化する（Ohta et al., 2014; Ujisawa et al., 2016）．ASJ の活動依存的に，ASJ のシナプスからインスリン様タンパク質（DAF-28 と INS-6）が分泌される．これらのインスリン様タンパク質は，腸や神経系にあるインスリン受容体 DAF-2 によって受容されることで，低温耐性を負に制御する（Ohta et al., 2014）．また，インスリン経路の下流において，腸からステロイドホルモンを介して精子関連細胞へ情報が送られ，精子が何らかの機構を介して温度受容ニューロン ASJ の神経活動を負にフィードバック制御していることが見つかっている（Sonoda et al., 2016）．ADL 温度受容ニューロンでは，温度感受性 TRP チャネルである OSM-9 と OCR-2 が温度受容体として機能する（Ohnishi et al., 2020; Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018）．一方で，OSM-9/OCR-2 の温度受容能は従来知られている温度感受性 TRP チャネルの約 1/10 しかないため，他の温度受容体の存在も考えられている（Ohnishi et al., 2020）．ASG 温度受容ニューロンでは，DEG/ENaC タイプのメカノ受容体である DEG-1 が温度を受容し，低温耐性を正に制御している（Takagaki et al., 2020）．さらに，ヒトの DEG/ENaC である MDEG1 も温度を受容していたため，線虫の研究からヒトの新たな温度受容体が見つかってきた（Takagaki et al., 2020）．

4．温度馴化を促進する全身周回性の神経回路の同定

これまでの低温耐性を指標とした解析から温度受容ニューロンにおける新規の温度受容機構が次々と見つかってきたが，その一方で，温度受容ニューロンで受け取られた温度情報が，どのような下流の神経ネットワークに影響を与え，それがどの組織を制御することで低温耐性および温度馴化の獲得や欠失が起こるのかに関しては未知の点が残されていた．そこで，ここからは，温度

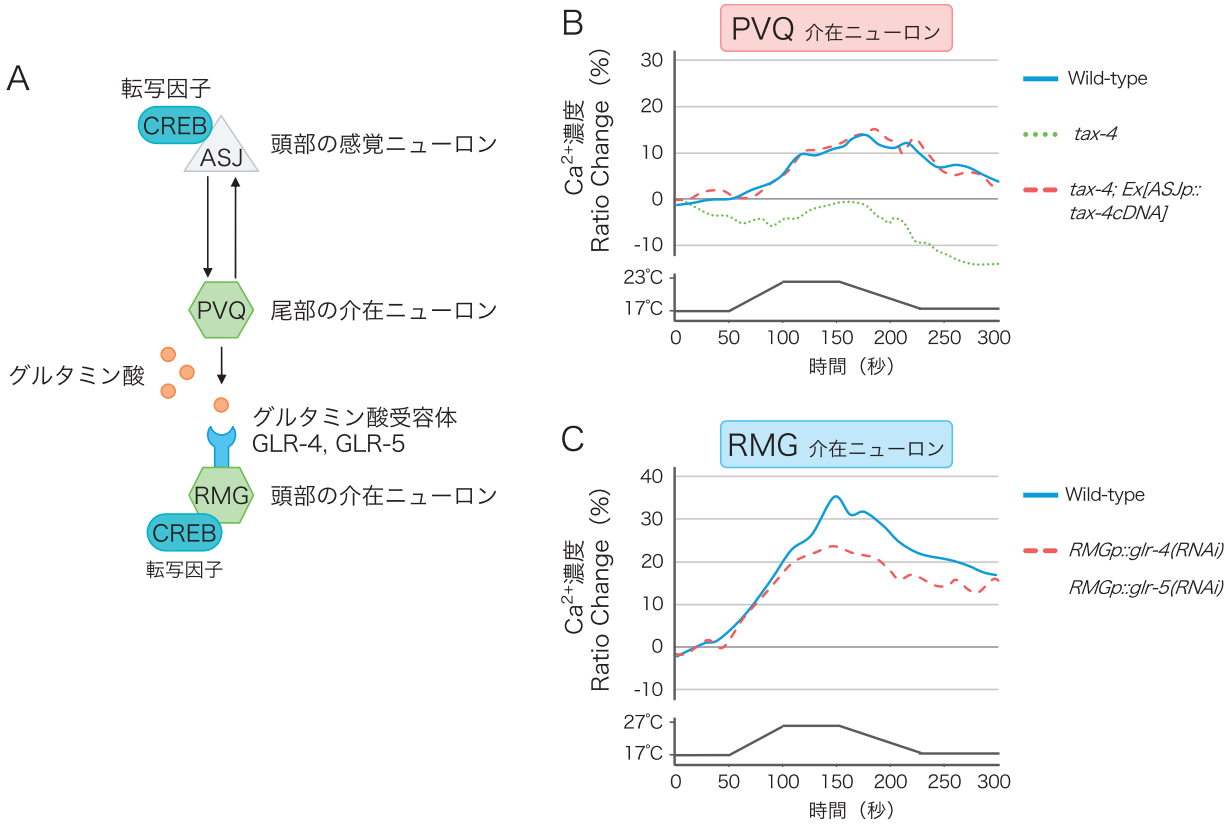


図 3：温度馴化促進の神経回路と神経活動の測定
（A）温度馴化を促進する神経回路の模式図．転写因子 CREB が ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンで機能し，温度馴化の制御に関わる．ASJ 温度受容ニューロンから，PVQ 介在ニューロンを介して RMG 介在ニューロンに温度情報が伝達される．PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンへの情報伝達はグルタミン酸によって行われる．（B）PVQ 介在ニューロンの神経活動の測定結果．*tax-4* 変異体の PVQ の神経活動は顕著に低下するが，ASJ 感覚ニューロンに *tax-4* cDNA を特異的に導入した系統（*tax-4;Ex[trx-1p::tax-4 cDNA]*）では，神経活動が野生株の PVQ と同じレベルに回復する．実験には 23℃ で飼育した系統を使用した．カルシウムインジケーターにはイエローカメレオン（ycx2.60）を用いた．個体数 ≥11．（Motomura et al., 2022）（C）RMG 介在ニューロンの神経活動の測定結果．RMG のグルタミン酸受容体（GLR-4，GLR-5）をノックダウンした系統の RMG は高温時の神経活動が野生株よりも低下していた．実験には 15℃ で飼育した系統を使用した．カルシウムインジケーターにはイエローカメレオン（yc3.60）を用いた．個体数 ≥18（Motomura et al., 2022）．

馴化に関する新規の神経回路と，その回路が腸の脂肪の貯蔵・動員を調整することで低温耐性と温度馴化が変化することを示した最新の論文を概説する（Motomura et al., 2022）．

低温耐性と温度馴化に神経系が関わることから，*C. elegans* からヒトまで広く保存され，記憶・学習に関わる転写因子である CREB（cAMP response element binding protein）が低温耐性と温度馴化に関わるかを調べた．CREB の機能が欠損した *crh-1* 変異体では，低温耐性は正常であったが，温度馴化が遅れていた．15℃ で飼育した *crh-1* 変異体を 3 時間 25℃ においても，生存率は約 50% に留まり，生存率が 0% に近づくには 18 時間要した．つまり，CREB の異常により温度馴化が遅れていた．*crh-1* 変異体の温度馴化の遅延が，どの組織における *crh-1* 遺伝子の異常によってもたらされているかを解析した．具体的には，特定の細胞でのみ遺伝子発現を誘導する様々なプロモーターを用いて，*crh-1* 変異体の特定の細胞に *crh-1* 遺伝子を発現させ，温度馴化遅延が回復するか検討した．その結果，頭部の ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンで同時に *crh-1* 遺伝子を発現させた *crh-1* 変異体において正常な温度馴化が見られた．しかし，*crh-1* 変異体の ASJ もしくは RMG のどちらかに *crh-1* 遺伝子を発現させた系統では，温度馴化遅延は回復しなかった．これらのことから，野生株において，ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンにおける CREB の機能が温度馴化に必須であることが分かった（図 3A）（Motomura et al., 2022）．

遺伝子によってコードされるカルシウムインジケーターを使い，ASJ 温度受容ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングで測定したところ，CREB は過去の飼育温度に依存して ASJ の温度感受性を変化させていた．ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロン

は共に頭部に存在するが，ASJ と RMG はシナプスやギャップ結合で直接繋がっていないため，神経回路レベルでの解析を進めるためには，ASJ と RMG の間を仲介するニューロンを探し出す必要があった．ASJ とも RMG とも接続しているニューロンを線虫の神経回路データベースから絞り込み，それらのニューロンにシナプス伝達を過活性化させることができるプロテインキナーゼ C（TTX-4/PKC-1）の構成的活性化遺伝子を導入した．その結果，尾部にある PVQ 介在ニューロンが過活性化している変異体において，温度馴化に異常が見られた．さらに，尾部の PVQ 介在ニューロンは，線虫全体を温度刺激した際に神経活動が上昇した．この尾部 PVQ の温度応答は，頭部の温度受容ニューロン ASJ の温度受容情報伝達に必須の cGMP 依存性チャネル TAX-4 の変異体で低下していたことから，頭部の ASJ 温度受容ニューロンが尾部の PVQ 介在ニューロンを活性化することが示唆された（図 3B）（Motomura et al., 2022）．

次に尾部の PVQ 介在ニューロンと頭部の RMG 介在ニューロンの関係を調べた．PVQ 介在ニューロンは神経伝達物質であるグルタミン酸を産生するニューロンである．PVQ のシナプス小胞にグルタミン酸を取り込む小胞性グルタミン酸輸送体 EAT-4 の機能が低下する変異体では，温度馴化が異常であった．同様に，頭部 RMG 介在ニューロンで発現するグルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 の変異体においても温度馴化の異常が見られた．さらに，RMG 介在ニューロンにおいて GLR-4 と GLR-5 の発現を抑制したところ，高温下で野生株よりも温度刺激時の RMG の神経活動が低下していた（図 3C）．これらのことから，尾部の PVQ 介在ニューロンはグルタミン酸を介して頭部の RMG 介在ニューロンに温度情報を伝達していることが分かった．つまり，頭部の ASJ 温度受容ニューロンが温度を受容すると，その情報は尾部の PVQ 介在ニューロンを介して，頭部の RMG 介在ニューロンに伝達されることが示唆された（図 3A）（Motomura et al., 2022）．

5．飼育温度によって変化する腸の脂質含量

RMG 介在ニューロンの下流でどのような生理的変化が引き起こされ，個体の温度馴化に繋がっているのかが次のクエスチョンであった．近年，線虫の寿命や摂食に関する腸の代謝の仕組みとして，神経ペプチド FLP-7 と腸にある神経ペプチド受容体 NPR-22 が，腸内のトリグリセリドリパーゼ ATGL-1 を活性化し，腸内の脂肪を分解することが報告されていた（Palamiuc et al., 2017）．そこで，それらの変異体の温度馴化を解析したところ，*flp-7* 変異体と *npr-22* 変異体において *crh-1* 変異体と同様の温度馴化の遅延が見られた（Motomura et al., 2022）．

頭部の RMG 介在ニューロンの下流でこの神経ペプチド FLP-7 の分泌が行われているかを調べるために，*flp-7* 変異体の RMG 特異的にグルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 を機能低下させる解析が行われた．この系統では，野生株の RMG 介在ニューロンで GLR-4 と GLR-5 を機能低下させた変異体と同様の温度馴化異常を示したことから，神経ペプチド FLP-7 は RMG 介在ニューロンの下流で分泌されていると考えられた（Motomura et al., 2022）．

神経ペプチド FLP-7 とその受容体 NPR-22 が温度馴化に関与していたことから，NPR-22 の下流で活性化するトリグリセリドリパーゼ ATGL-1 の解析を進めた．ATGL-1 は，脂肪滴の表面に存在する．脂肪滴に保持されているトリアシルグリセロールをジアシルグリセロールと遊離脂肪酸に分解するリパーゼである．ATGL-1 は腸で発現しており，*atgl-1* 遺伝子は 15℃ 飼育時よりも 25℃ 飼育時の方が高レベルで発現していた．ATGL-1 は脂肪を分解する活性を持つため，Oil Red O 染色と呼ばれる中性脂肪を赤色に染める色素を用いて，飼育温度の違いによる腸の脂肪量の変化を測定した．その結果，野生株では 15℃ 飼育時よりも 25℃ 飼育時の方が腸の中性脂肪の量が少なかった．これは 25℃ 飼育時に ATGL-1 の発現が増加し，腸の中性脂肪が分解されたためであろう（Motomura et al., 2022）．

本稿で紹介した最近の研究成果から，温度受容ニューロンを始点に，高温飼育下で頭部→尾部→頭部と全身を周回する神経回路が腸に働きかけ，脂肪量を減少させることが，線虫における飼育温度に依存した低温耐性の変化に重要であると示唆された（図 4）．

6．おわりに

本稿では，線虫 *C. elegans* の低温耐性と温度馴化について，過去の知見と最新の研究を紹介した．特に最新の全身周回性の神経回路による脳腸連関が低温耐性に関わるという発見は，低温生物学に限らず脳腸連関の研究分野においても重要な知見になるであろう．一方で，分子機構に関してはまだ多くのクエスチョンが残されている．例えば，頭部の ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンにおける転写因子 CREB の標的遺伝子に

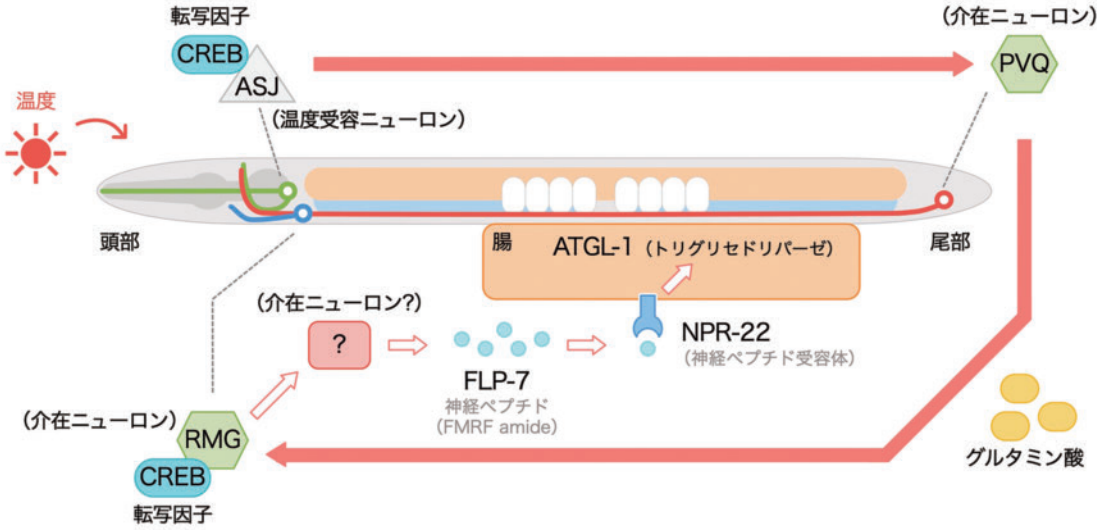


図 4：温度馴化を制御する飼育温度依存的な脳腸連関の神経回路モデル
ASJ 感覚ニューロンが温度を受容すると，PVQ 介在ニューロンからグルタミン酸を介して RMG 介在ニューロンへと情報が伝達される．温度情報を受け取った RMG は神経ペプチド FLP-7 の分泌を促し，それが腸にある受容体 NPR-22 で受容される．NPR-22 は腸のトリグリセリドリパーゼ ATGL-1 を活性化し，腸の脂肪分解が促進される（Motomura et al., 2022）．

関しては，未知であるため，次世代 DNA シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析が突破口を開く可能性がある．神経ペプチド FLP-7 の分泌細胞は不明のままであることから，どのような細胞であるか，そしてその生理的機能についても興味が湧く．さらに，温度受容ニューロン ASJ と ADL における温度受容体の同定にも大いに興味が湧く．線虫からヒトまで保存された生体調節機構は多数存在するため，今後の本研究分野の発展に期待する．

7．謝辞

本稿で紹介した研究は，甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成，木下記念事業団，内藤記念科学財団，武田科学振興財団，鈴木謙三記念医科学応用記念財団，G7 財団 PRIME AMED（マルチセンシング領域），日本学術振興会 KAKENHI（22H05512; 21H02534; 21K19279; 21K06275; 21J20026），持田記念医学薬学振興財団，光科学技術研究振興財団，島津科学技術振興財団，旭硝子財団，ブレインサイエンス振興財団の支援により行われた．

参考文献

Brenner, S. (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*, **77** (1), 71–94.

C. elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science*, **282** (5396), 2012–2018.

Cook, S. J., T. A. Jarrell, C. A. Brittin, Y. Wang, A. E. Bloniarz, M. A. Yakovlev, K. C. Q. Nguyen, L. T. H. Tang, E. A. Bayer, J. S. Duerr, H. E. Bülow, O. Hobert, D. H. Hall and S. W. Emmons (2019) Whole-animal connectomes of both Caenorhabditis elegans sexes. *Nature*, **571** (7763), 63–71.

Kage-Nakadai, E., A. Ohta, T. Ujisawa, S. Sun, Y. Nishikawa, A. Kuhara and S. Mitani (2016) Caenorhabditis elegans homologue of Prox1/Prospero is expressed in the glia and is required for sensory behavior and cold tolerance. *Genes Cells*, **21** (9), 936–948.

Kuhara, A., N. Ohnishi, T. Shimowada and I. Mori (2011) Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in Caenorhabditis elegans. *Nature communications*, **2**, 355.

Kuhara, A. and A. Ohta (2018) Temperature response in cold tolerance of C. elegans. *Impact*, **2018** (7), 44–46.

Miyara, A., A. Ohta, Y. Okochi, Y. Tsukada, A. Kuhara and I. Mori (2011) Novel and conserved protein macoilin is required for diverse neuronal functions in Caenorhabditis elegans. *PLoS Genetics*, **7** (5), e1001384.

Motomura, H., M. Ioroi, K. Murakami, A. Kuhara and A. Ohta (2022) Head-tail-head neural wiring underlies gut fat storage in Caenorhabditis elegans temperature acclimation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **119** (32), e2203121119.

Nishio, N., A. Mohri-Shiomi, Y. Nishida, N. Hiramatsu, E. Kodama-Namba, K. D. Kimura, A. Kuhara and I. Mori (2012) A novel and conserved protein AHO-3 is required for thermotactic plasticity associated with feeding states in Caenorhabditis elegans. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, **17** (5), 365–386.

Ohnishi, K., S. Saito, T. Miura, A. Ohta, M. Tominaga, T. Sokabe and A. Kuhara (2020) OSM-9 and OCR-2 TRPV channels are accessorial warm receptors in Caenorhabditis elegans temperature acclimatisation. *Sci Rep*, **10** (1), 18566.

Ohnishi, K., N. Takagaki, M. Okahata, M. Fujita, A. Ohta and A. Kuhara (2019) Molecular and Cellular Network Systems Underlying Cold Tolerance of Caenorhabditis elegans. *Cryobiology and Cryotechnology*, **64** (2), 53–59.

Ohta, A. and A. Kuhara (2013) Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of Caenorhabditis elegans. *Neuroscience research*, **76** (3), 119–124.

Ohta, A., T. Ujisawa, S. Sonoda and A. Kuhara (2014) Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in Caenorhabditis elegans. *Nat Commun*, **5**, 4412.

Okahata, M., H. Motomura, A. Ohta and A. Kuhara (2022) Molecular physiology regulating cold tolerance and acclimation of Caenorhabditis elegans. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **98** (3), 126–139.

Okahata, M., A. Ohta, H. Mizutani, Y. Minakuchi, A. Toyoda and A. Kuhara (2016) Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in Caenorhabditis elegans. *J Comp Physiol B*, **186** (8), 985–998.

Okahata, M., A. D. Wei, A. Ohta and A. Kuhara (2019) Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in Caenorhabditis elegans. *Sci Adv*, **5** (2), eaav3631.

Palamiuc, L., T. Noble, E. Witham, H. Ratanpal, M. Vaughan and S. Srinivasan (2017) A tachykinin-like neuroendocrine signalling axis couples central serotonin action and nutrient sensing with peripheral lipid metabolism. *Nat Commun*, **8**, 14237.

Sonoda, S., A. Ohta, A. Maruo, T. Ujisawa and A. Kuhara (2016) Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of Caenorhabditis elegans. *Cell Rep*, **16** (1), 56–65.

Takagaki, N., A. Ohta, K. Ohnishi, A. Kawanabe, Y. Minakuchi, A. Toyoda, Y. Fujiwara and A. Kuhara (2020) The mechanoreceptor DEG-1 regulates cold tolerance in Caenorhabditis elegans. *EMBO Rep*, e48671.

Takeishi, A., N. Takagaki and A. Kuhara (2020) Temperature signaling underlying thermotaxis and cold tolerance in Caenorhabditis elegans. *J Neurogenet*, 1–12.

Taylor, S. R., G. Santpere, A. Weinreb, A. Barrett, M. B. Reilly, C. Xu, E. Varol, P. Oikonomou, L. Glenwinkel, R. McWhirter, A. Poff, M. Basavaraju, I. Rafi, E. Yemini, S. J. Cook, A. Abrams, B. Vidal, C. Cros, S. Tavazoie, N. Sestan, M. Hammarlund, O. Hobert and D. M. Miller, 3rd (2021) Molecular topography of an entire nervous system. *Cell*, **184** (16), 4329–4347 e4323.

Ujisawa, T., A. Ohta, T. Ii, Y. Minakuchi, A. Toyoda, M. Ii and A. Kuhara (2018) Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in Caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Ujisawa, T., A. Ohta, O. M., S. S. and A. Kuhara (2014) Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in C. elegans. *Protocol Exchange*.

Ujisawa, T., A. Ohta, M. Uda-Yagi and A. Kuhara (2016) Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in Caenorhabditis elegans. *PLoS One*, **11** (10), e0165518.

White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1986) The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **314** (1165), 1–340.

Yemini, E., A. Lin, A. Nejatbakhsh, E. Varol, R. Sun, G. E. Mena, A. D. T. Samuel, L. Paninski, V. Venkatachalam and O. Hobert (2021) NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in C. elegans. *Cell*, **184** (1), 272–288 e211 .

低温科学 81 （2023） 27–36
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 27

膜脂質を介する低温適応の新規メカニズムの発見：細胞自律的な細胞内温度制御

村上　光[1)]，長尾　耕治郎[2)]，梅田　眞郷[3, 4)]

2022 年 12 月 15 日受付，2023 年 1 月 10 日受理

温度は，生物にとって最も身近な環境因子の一つであり，生命活動に強く影響する．そのため，動物は自らの体温を調節する様々な手段を獲得することにより，環境に適応してきた．しかしながら，生命の最小単位である個々の細胞における温度制御の実態は長らく不明であった．我々は近年開発された細胞内温度計測技術を駆使し，ショウジョウバエ培養細胞内の温度がミトコンドリア熱産生により維持されていること，この現象に生体膜の流動性の制御に必須である Δ9 脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 が寄与することを見出した．今回の発見から，我々は「生体膜を介する細胞自律的な細胞内温度制御」という生命における温度制御の新規メカニズムを提唱した．

A novel membrane-mediated mechanism for cold adaptation through the cell-autonomous control of intracellular temperature

Akira Murakami[1], Kohjiro Nagao[2], Masato Umeda[3,4]

Intracellular temperature can affect a wide range of cellular functions; however, it remains unclear whether or not the temperature of individual cells is controlled in response to fluctuations of the environmental temperature. Using two mechanistically independent intracellular thermometers, we found that the intracellular temperature of *Drosophila* cells is maintained by mitochondrial thermogenesis. Moreover, we determined that Δ9-fatty acid desaturase DESAT1, which is essential for regulating membrane fluidity in cold environments via biosynthesis of unsaturated fatty acids, plays a critical role in mitochondrial thermogenesis. Our findings shed light on a novel cell-autonomous mechanism for intracellular temperature control during environmental temperature changes.

キーワード：細胞内温度，リン脂質，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素，ミトコンドリア熱産生
Intracellular temperature, Phospholipid, Δ9-fatty acid desaturase, Mitochondrial thermogenesis

1．はじめに

温度は，生化学反応や生体分子の動態を支配する物理化学的因子である．近年開発された細胞内温度計測技術は，定常状態の細胞内の温度が細胞外の温度とは異なっていることを実験的に示してきた（Zhou et al., 2020）．

連絡先
村上　光
静岡県立大学薬学部　統合生理学分野
〒422–8526　静岡県静岡市駿河区谷田 52–1
Tel. 054–264–5731
e-mail：murakami_a@u-shizuoka-ken.ac.jp
1）静岡県立大学薬学部
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52–1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422–8526, Japan
2）京都薬科大学　薬品物理化学分野
Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Misasaginakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607–8414, Japan
3）ホロバイオ株式会社
HOLO BIO Co., Ltd, Katsura Innovation Park 1–36, Nishikyo-ku, Kyoto 615–8245, Japan
4）同志社大学　メカノバイオロジー研究センター
Research Institute for Mechanobiology, Doshisha University, 1–3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe-shi, Kyoto 610–0394, Japan

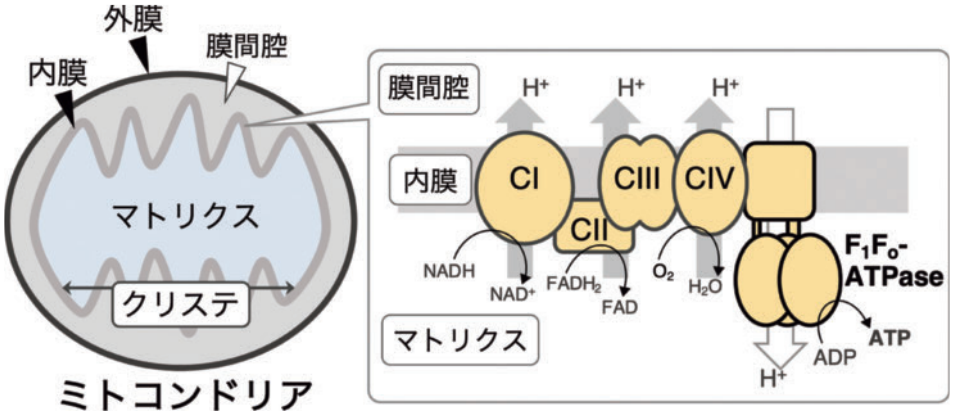


図 1：ミトコンドリアの構造と呼吸鎖複合体による ATP 産生．CI, NADH デヒドロゲナーゼ；CII，コハク酸デヒドロゲナーゼ；CIII，ユビキノール-シトクロム c レダクターゼ；CIV，シトクロム c オキシダーゼ．

さらに，細胞内の温度がエネルギー代謝や細胞内 Ca^{2+} 動態といった細胞内小器官の機能と連動して変動していること，細胞内のみならず細胞内小器官内のレベルで不均一な温度分布が存在していることも明らかになってきた（Kiyonaka et al., 2013; Okabe et al., 2012）．これらの発見は，単一細胞内の温度がこれまで考えられてきたよりも緻密に時空間的に制御されている可能性を強く示唆していた．また，仮に 1 細胞レベルの温度が生命現象に強く寄与しているとすると，環境温度の変化に対する細胞内温度の制御は変温動物の生命機能のみならず恒温動物においても末梢組織の機能の恒常性維持において必須であることが想定される．しかしながら，個々の動物細胞が環境温度の変化に応じて細胞内温度を自律的に制御するのかはよくわかっていなかった．

細胞内温度に影響を与える主要な細胞内小器官として，ミトコンドリアが挙げられる．ミトコンドリアは，エネルギー産生，Ca^{2+} 恒常性の維持，シグナル伝達といった，幅広い生物学的プロセスに不可欠な役割を担っており，中でもミトコンドリア呼吸（酸化的リン酸化）を介するアデノシン 3 リン酸（ATP）の産生は生命活動に極めて重要である（Detmer and Chan, 2007）．ミトコンドリアは内膜と外膜の 2 つの脂質膜からなっており，内膜はクリステと呼ばれる特徴的な折り畳み構造を有している（Formosa and Ryan, 2018）．このミトコンドリア内膜では，ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I–IV によるマトリクスから膜間腔へのプロトン輸送を介して膜を隔てたプロトン勾配が形成され，この電気化学的ポテンシャル差を駆動力として F_1F_o-ATPase がアデノシン 2 リン酸（ADP）を ATP に変換している（図 1）．一方で，プロトン勾配の形成プロセスが ATP 合成から脱共役した場合には熱が産生され得ることから，ミトコンドリアは動物個体における低温適応にも重要な役割を果たすと考えられてきた（Cannon and Nedergaard, 2004）．実際，寒冷刺激時には脱共役タンパク質を介したプロトン漏出の促進により，熱産生が亢進されることが知られている（Fedorenko et al., 2012）．また，最近では ATP 合成と共役したミトコンドリア呼吸の活性も熱産生に寄与していることが明らかになりつつある（Rahbani et al., 2021; Sun et al., 2021）．このような背景から，細胞内温度計測に関する先行研究としてミトコンドリアの熱産生能に着目したものが多数存在し，例えば哺乳動物細胞内においてミトコンドリアの温度は 50℃ 程度と見積もられている（Chretien et al., 2018）．このような個々の細胞におけるミトコンドリア熱産生の調節メカニズムを理解することが，細胞内温度の制御を解明する上で重要であると考えられる．

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を介したミトコンドリア機能の制御因子として，ミトコンドリアの膜脂質が知られている（Ikon and Ryan, 2017）．膜脂質の主成分であるリン脂質は，グリセロール骨格にリン酸ジエステルを介して結合した親水性頭部，及びエステル結合した疎水性アシル鎖（脂肪酸）から成る構造を有しており（図 2A），ミトコンドリアリン脂質はアシル鎖に不飽和脂肪酸を豊富に含むことが知られてきた（Hoch, 1992）．リン脂質アシル鎖における不飽和脂肪酸の含量は，様々な細胞機能に重要であるタンパク質–脂質相互作用，及び流動性や張力といった生体膜の物理化学的特性を規定する因子である（Holthuis and Menon, 2014）．一方で，膜の物理化学的性質は環境温度にも強く影響を受けることから，リン脂質における不飽和脂肪酸含量の調節は環境の温度変化に対する細胞機能の恒常性維持（温度適応）に寄与することも想定されてきた（Los and Murata,

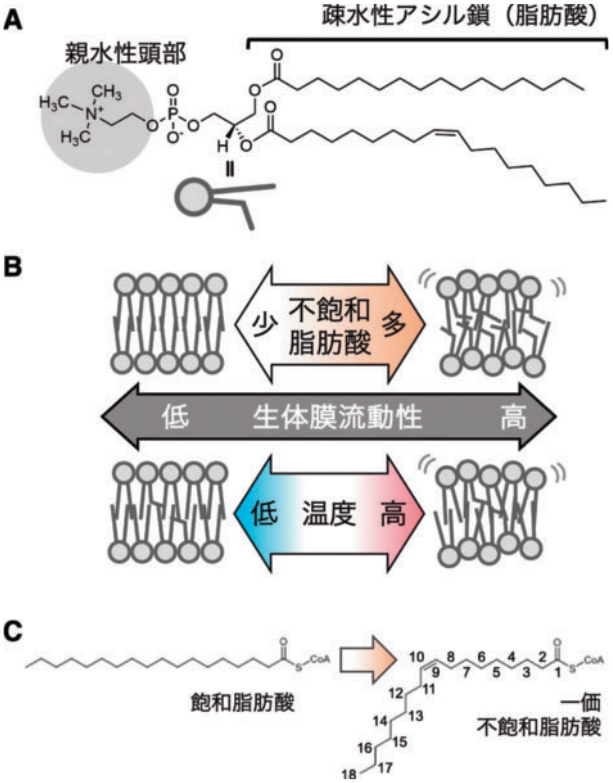


図 2：生体膜脂質における低温応答．A，生体膜の主要構成因子であるリン脂質の構造（**図はホスファチジルコリン（PC34：1）**）．B，生体膜の流動性を変化させる要因，C，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素が触媒する化学反応．

2004）（図 2B）．特に，膜流動性が低下する低温環境では膜リン脂質中の不飽和脂肪酸含量が増加すること，この現象に，アシル CoA の Δ9 位に *cis*-二重結合を導入する Δ9 脂肪酸不飽和化酵素が関与することがよく知られている（Nakagawa et al., 2002; Tiku et al., 1996）（図 2C）．

我々は，これまでショウジョウバエ培養細胞 S2 を用いて Δ9 脂肪酸不飽和化酵素，並びに不飽和脂肪酸を含有した膜リン脂質と細胞機能との関連に関して研究を進めてきた（Nagao et al., 2019）．S2 細胞では，生体膜脂質の研究に従来用いられてきた哺乳動物細胞とは異なり，コレステロールや多価不飽和脂肪酸といった生体膜の物理化学的性質に強く影響を与える脂質分子の含量が低く，さらに Δ9 脂肪酸不飽和化酵素として唯一 DESAT1 しか発現していない．そのため，S2 細胞は膜リン脂質における脂肪酸組成の操作，並びにその細胞機能へのアウトプットを解釈し易いモデル細胞であると言える．本稿では，我々の最近の研究により明らかとなった，生体膜脂質と細胞内温度との関連について紹介する（Murakami et al., 2022）．

2．Δ9 脂肪酸不飽和化酵素はミトコンドリア熱産生を介して細胞内温度の維持に関与する

我々は研究にあたり Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 システムを用いて，*Desat1* 遺伝子欠損 S2 細胞を樹立した．同細胞は Δ9 脂肪酸不飽和化酵素活性を欠失しており，パルミトレイン酸（C16：1）やオレイン酸（C18：1）といった不飽和脂肪酸に対する栄養要求性を示したため，血清由来の脂肪酸に加え過剰量の不飽和脂肪酸（50 μM C16：1 及び 50 μM C18：1）が添加された培養培地にて維持する必要があった．通常培地にて *Desat1* 遺伝子欠損 S2 細胞を 16 時間培養すると，リン脂質のアシル鎖において DESAT1 の産物である C16：1 及び C18：1 を中心とした不飽和脂肪酸の割合が減少し，飽和脂肪酸の割合は増加した．この脂肪酸組成の変化は C16：1 及び C18：1 を添加した培地で培養した際には完全に抑制された．

S2 細胞の細胞内温度を計測するために，合成高分子型の分子温度計である Fluorescent Polymeric Thermometer（FPT）を用いた（図 3A）（Hayashi et al., 2015; Okabe *et al.*, 2012）．今回用いた FPT は細胞膜透過性を有しており，5% グルコース水溶液に溶解すると S2 細胞内に 10 分以内で取り込まれた．まず，S2 細胞内の FPT の蛍光寿命が培養培地の温度上昇に伴い延長することが確認された（20℃–30℃）．そこで，通常の培養条件である 25℃ の培養培地下において，*Desat1* 遺伝子欠損細胞内の FPT の蛍光寿命を測定したところ，野生株の値と比較して有意に短いことを見出した．また，この FPT 蛍光寿命値の低下は培養培地への不飽和脂肪酸（50 μM C16：1 及び 50 μM C18：1）の添加，もしくは DESAT1 の強制発現により回復したことから，*Desat1* 遺伝子の欠損が細胞内温度の低下を引き起こすことが示された．続いて，DESAT1 の薬理的阻害（SCD1 阻害剤 “37c”，以下 DESAT1 阻害剤と呼称）（Uto et al., 2009）が S2 細胞の細胞内温度に与える影響を解析した．S2 細胞を DESAT1 阻害剤で 16 時間処理するとリン脂質のアシル鎖における不飽和脂肪酸の含量が約 25% 減少し（Murakami et al., 2017），*Desat1* 遺伝子欠損の表現型と類似して生育が著しく抑制された．この DESAT1 阻害剤の処理により，S2 細胞内の FPT の蛍光寿命は有意に短縮した．この際の FPT の蛍光寿命値の変化から，DESAT1 の阻害による細胞内の温度変化は 4℃ 程度と見積もられた．また，この DESAT1 阻害剤による細胞内温度の低下は不飽和脂肪酸（C16：1 もしくは C18：1）の培養培地への添加によって回復した一方で，飽和脂肪

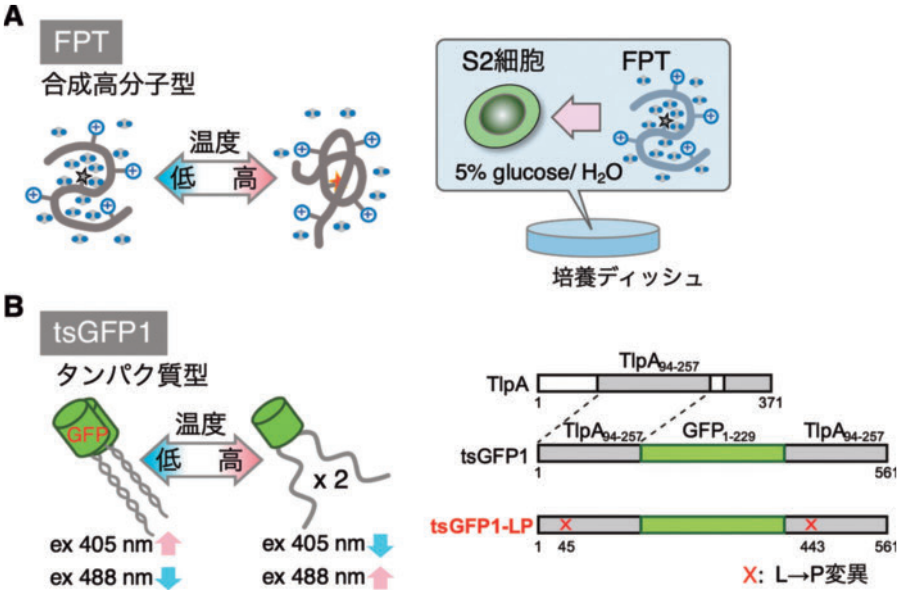


図 3：本稿で示した細胞内温度計．A，蛍光性ポリマー温度センサー FPT．B，蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP1.

酸（C16：0）の添加では同様の効果は得られず，DESAT1 阻害剤の高い特異性が強く示唆された．これらの結果から，定常状態の S2 細胞の細胞内温度が DESAT1 の欠失，もしくは阻害により低下することが明らかとなった．

また，緑色蛍光タンパク質（GFP）をベースとした分子温度計である tsGFP を用いた細胞内温度計測も行った（Kiyonaka *et al.*, 2013）．tsGFP は GFP と *Salmonella* 由来 TlpA の Coiled-Coil 領域を遺伝子工学的に融合して作製されたものであり，温度依存的な TlpA の構造変化（ダイマー形成）に伴い GFP の蛍光スペクトル特性が変化するよう設計されている．哺乳動物における温度計測のために開発された tsGFP1 の温度応答領域は 37℃付近であり，至適培養温度が 25℃であるショウジョウバエ細胞の細胞内温度の測定には適さなかった．そこで，より低温域に応答するように TlpA 領域に Coiled-Coil 構造を不安定化させるプロリン変異（L137P）が導入された変異体（tsGFP1-LP）を用いた（図 3B）．tsGFP1-LP を S2 細胞に発現させると，tsGFP1-LP は培養培地の温度変化に対する応答性を示し（20℃–30℃），温度上昇に伴い蛍光強度のレシオ値（ex405 nm/ex488 nm）が低下した．この tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値は DESAT1 阻害剤の処理により上昇したことから，FPT による実験結果，即ち DESAT1 の阻害による細胞内温度の低下が裏付けられた．また，細胞内熱産生に強く寄与すると報告されているミトコンドリア呼吸に着目し，ミトコンドリア呼吸の薬理的阻害が細胞内温度に与える影響を解析したところ，ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤であるロテノンにより S2 細胞内の tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値が上昇すること，つまり細胞内温度が低下することを見出した．このことから，S2 細胞内の温度制御にミトコンドリア呼吸活性が強く寄与していることが示された．さらに，ロテノンで処理した際の tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値に関して，DESAT1 の阻害の有無で有意な差は見られなかったため，DESAT1 はミトコンドリア呼吸鎖の活性に依存して細胞内温度に影響を与えていることも示唆された．

遺伝子工学ベースのセンサーを用いる長所として，標的化配列を付与することによりセンサータンパク質を容易かつ特異的に細胞内小器官に局在化できることが挙げられる．そこで，COXVIII 由来のミトコンドリア標的化配列を融合した tsGFP1-LP-mito を用いた．共焦点顕微鏡による観察により，tsGFP1-LP-mito とミトコンドリアマーカーである Mito Tracker Deep Red が共局在することが確認された．また，tsGFP1-LP と同様に tsGFP1-LP-mito の蛍光強度のレシオ値（ex405 nm/ex488 nm）は培養培地の温度変化（20℃–30℃）に応答した．そこで，S2 細胞におけるミトコンドリア熱産生とミトコンドリア呼吸活性との連関を検証した．まず，ロテノンにより tsGFP1-LP-mito 蛍光強度レシオ値が上昇することが示され，ミトコンドリアの温度がミトコンドリア呼吸により維持されていることが示された．また，DESAT1 阻害剤により tsGFP1-LP-mito の蛍光強度レシオ値は上昇し，これは培養培地への C18：1 の添加によ

り抑制されたことから，不飽和脂肪酸の生合成がS2細胞のミトコンドリアの温度を上昇させていることがわかった．以上，細胞内温度計測により，DESAT1を介する不飽和脂肪酸の産生が，ミトコンドリア呼吸を介した細胞内温度維持のメカニズムに関与していることが明らかとなった．

3．Δ9脂肪酸不飽和化酵素はミトコンドリア膜脂質の制御によりミトコンドリア熱産生を制御する

ここまでの結果から，ミトコンドリアにおける呼吸と熱産生との関連に焦点を絞り，これらに対するDESAT1の寄与を評価した．ミトコンドリア呼吸の活性の指標であるミトコンドリア膜電位，及び酸素消費速度を解析したところ，DESAT1がATP合成と共役したミトコンドリア呼吸に寄与すること，これによりS2細胞内のミトコンドリア膜電位，並びに細胞内温度が維持されていることが示された．さらに，タンパク質複合体を解析できるBlue native-polyacrylamide gel electrophoresis（BN-PAGE）により，DESAT1を阻害した細胞群においてミトコンドリアのATP合成を司るF_1F_o-ATPaseの複合体が崩壊することを見出した．また，この際にミトコンドリア画分におけるF_1F_o-ATPase活性が低下していることも明らかとなった．

F_1F_o-ATPaseの構造や機能は，ミトコンドリア膜構造と強く連関することが報告されている（Rabl et al., 2009）．そこで，透過型電子顕微鏡によりS2細胞内の微細構造を観察した．先行研究における観察結果と同様に（Abdelwahid et al., 2007），S2細胞において多くのミトコンドリアは秩序だったクリステ構造を有する伸長した形態（“クリステ含有ミトコンドリア”と呼称）を呈していた．一方で，乱れたクリステ構造や丸く膨潤した形態を有するミトコンドリアも見受けられた．このようなミトコンドリアの構造とDESAT1との関連を調査したところ，DESAT1阻害剤により処理した細胞群や*Desat1*遺伝子を欠損した細胞群ではクリステ含有ミトコンドリアの割合が低下することを見出した．これらの結果から，DESAT1はミトコンドリア内膜のクリステ構造の制御を介してF_1F_o-ATPaseを制御することが想定された．ミトコンドリア内膜の制御因子として膜融合に関与するOPA1が知られており，OPA1の過剰発現はミトコンドリアクリステ構造を強固にすることが報告されている（Civiletto et al., 2015; Varanita et al., 2015）．このOPA1を過剰発現したS2細胞では，DESAT1阻害剤の処理によるクリステ含有ミトコンドリアの低下が抑制された．さらに，DESAT1阻害剤により引き起こされるミトコンドリア呼吸活性の低下やF_1F_o-ATPase複合体の崩壊，さらには細胞内温度の低下も抑制されていた．一方で，OPA1の発現レベルはDESAT1の阻害による影響は見られなかったため，DESAT1を阻害した細胞群におけるクリステ形成の不全はOPA1の発現低下により生じたわけではないこともわかった．これらの結果から，DESAT1はミトコンドリア内膜のクリステ構造の制御を介してF_1F_o-ATPaseを制御することにより，定常状態のS2細胞の細胞内温度を制御することが示された（図4A）．

DESAT1は，一価不飽和脂肪酸を産生するΔ9脂肪酸不飽和化酵素であることから，DESAT1によるミトコンドリア膜脂質の制御を調査した．まず，C末端にHAタグが付加されたDESAT1（DESAT1-HA）の細胞内局在を解析したところ，哺乳動物や酵母のΔ9脂肪酸不飽和化酵素に関する先行研究の結果と一致して（Kato et al., 2006; Tatzer et al., 2002），小胞体（ER）マーカー（Bip-GFP-KDEL）との共局在が観察された．一方で，DESAT1-HAは，ミトコンドリアマーカー（Mito-EGFP）にも極めて近接しているようにも見られた．これを裏付けるように，生化学的に細胞内小器官を分画すると，DESAT1はER画分というよりも粗ミトコンドリア画分に検出されることが判明した．続いて，この粗ミトコンドリア画分の脂質分子組成を三連四重極型質量分析装置により解析したところ，16時間のDESAT1阻害剤の処理では，不飽和脂肪酸を含有したホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）分子種の含量が顕著に変化していることがわかった．特に，PC（32：2），PC（34：2），PC（36：2）のような2つの一価不飽和脂肪酸を含有したPC分子種の量はDESAT1阻害によりそれぞれ90%，90%，86%減少した．また，PE（32：2），PE（34：2），PE（36：2）のような2つの一価不飽和脂肪酸を含有したPE分子種の量もDESAT1阻害剤により52%，46%，44%それぞれ減少した．ミトコンドリアに特有のリン脂質分子種であるカルジオリピン（CL）については，S2細胞における主要なCL分子種の一つであるCL（64：4）がDESAT1の阻害により有意に減少していた．

4．低温環境ではΔ9脂肪酸不飽和化酵素依存的にミトコンドリア呼吸が活性化する

DESAT1による細胞内温度制御の生物学的意義を検証する上で，環境温度の変化との生体膜脂質の制御との

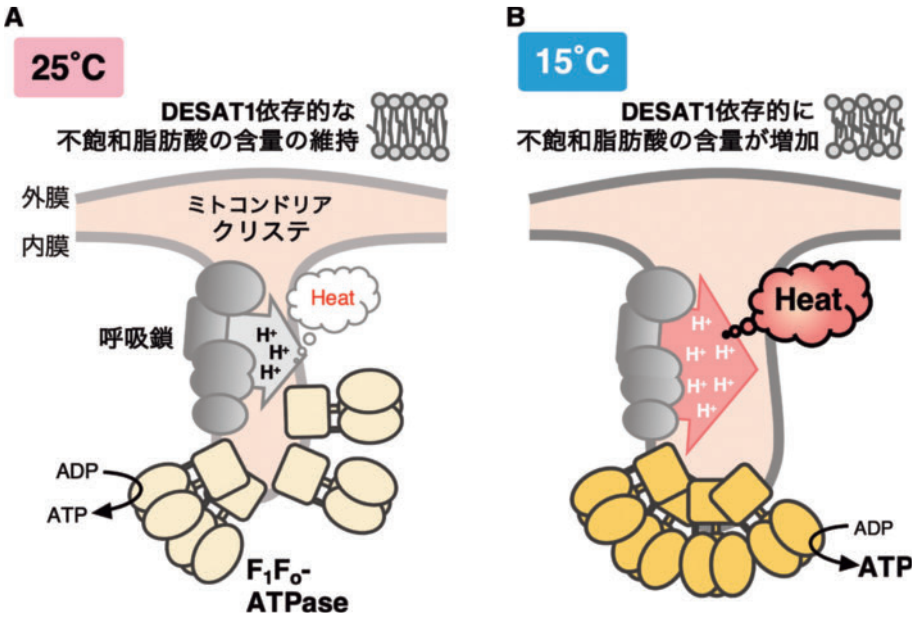


図 4：Δ9 脂肪酸不飽和化酵素による細胞内温度制御メカニズム．A，至適生育温度（25℃）におけるミトコンドリア呼吸を介する熱産生の維持．B，低温環境（15℃）におけるミトコンドリア呼吸の活性化．

関連に着目した．前述の通り，先行研究では低温曝露時にリン脂質のアシル鎖における不飽和脂肪酸の含量がΔ9 脂肪酸不飽和化酵素に依存して増加することが報告されている．他方，我々は DESAT1 の過剰発現が S2 細胞におけるクリステ含有ミトコンドリアの増加，並びにミトコンドリア呼吸の活性化を誘導するのみならず，ミトコンドリア温度を上昇させることを観察していた．そこで，低温環境では DESAT1 を介する不飽和脂肪酸の産生が亢進することにより F_1F_o-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が増強されるのではないかと仮説を立てた．

S2 細胞を通常の培養条件よりも 10℃低い 15℃で 4 時間培養すると，リン脂質アシル鎖における C16：1 の割合が低温曝露時に DESAT1 依存的に増加した．この際の粗ミトコンドリア画分のリン脂質を詳細に解析すると，PC（32：2），PC（34：2），PE（32：2）のような 2 つの一価不飽和脂肪酸を含有した分子種の量が増加していた．これらの結果から，S2 細胞では DESAT1 を介するミトコンドリア膜脂質の不飽和化が低温曝露時に亢進されることが示された．

続いて，この低温曝露時のミトコンドリア呼吸の活性を評価した．まず，DESAT1 の過剰発現の効果と同様に，S2 細胞のミトコンドリア膜電位が低温曝露時に 2 倍に上昇することを見出した．この低温誘導性のミトコンドリア膜電位上昇は，DESAT1 阻害剤処理細胞や *Desat1* 遺伝子欠損細胞では有意に抑制された．加えて，低温誘導性の膜電位上昇は F_1F_o-ATPase 阻害剤であるオリゴマイシンにより抑制されたことから，低温誘導性の膜電位上昇が F_1F_o-ATPase の活性に依存していること，また，F_1F_o-ATPase によるプロトン勾配の消費が抑制されたことによるものではないことが示された．低温曝露におけるプロトン勾配形成の動態をさらに評価するために，ロテノン処理後のミトコンドリア膜電位の回復速度を解析した．まず，ミトコンドリア膜電位の回復が F_1F_o-ATPase 活性依存的であることを見出した．さらに，このミトコンドリア膜電位の回復速度が低温曝露により上昇すること，これが DESAT1 の阻害により抑制されることが示された．これらの結果から，低温曝露時のミトコンドリア膜電位の上昇は，F_1F_o-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が DESAT1 依存的に活性化することにより引き起こされていることが示唆された．

最後に，低温環境下における F_1F_o-ATPase の機能や構造を調査した．S2 細胞を 15℃で 4 時間培養すると，複合体を形成した F_1F_o-ATPase の割合が約 2.2 倍増加し，ミトコンドリア画分にて検出される F_1F_o-ATPase 活性が 1.4 倍程度上昇した．また，これらはいずれも DESAT1 の阻害や欠損により抑制された．さらに，この低温曝露時にはクリステ含有ミトコンドリアが増加すること，これが DESAT1 阻害剤処理細胞群や *Desat1* 遺伝子欠損細胞では見られないこともわかった．以上，低温環境では DESAT1 によるクリステのリモデリングを介して F_1F_o-ATPase の活性が向上し，ミトコンドリア

呼吸が活性化することが示された．S2 細胞では熱産生と共役しているミトコンドリア呼吸鎖の活性が F_1F_o-ATPase 依存的に制御されているという実験結果を考慮すると，これらのデータは環境温度の変化における細胞内温度の細胞自律的な制御機構が存在することを強く示唆するものと考えられた（図 4B）．

5．考察　～膜脂質を介する細胞内温度制御～

今回，我々の研究により，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 がミトコンドリア呼吸を介した細胞内温度の細胞自律的な制御に関与することが明らかとなった．さらに，低温曝露時にはミトコンドリア呼吸活性が DESAT1 依存的に増強されることを発見した．このため，低温環境における不飽和脂肪酸を含有したリン脂質の産生は，生体膜の物理化学的な性質の制御のみならず，低温環境に応答したミトコンドリア呼吸の向上に関与している可能性が示された．

先行研究では，ミトコンドリアリン脂質はミトコンドリア呼吸活性の極めて重要な制御因子であることが示されてきた．例えば，CL 及び PE 分子種は，適切なミトコンドリア融合やミトコンドリア膜電位の維持に重要であることが知られている（Brandner et al., 2005; Joshi et al., 2012）．加えて，CL 分子は F_1F_o-ATPase に直接結合し，これが F_1F_o-ATPase の複合体形成に必須であることも報告されている（Duncan et al., 2016）．一方で，CL に関する先行報告では，哺乳動物細胞の CL はアシル鎖にリノール酸（C18：2）を多く含むこと，この C18：2 に富んだ成熟 CL がミトコンドリア機能に寄与することが示されている（Minkler and Hoppel, 2010）．今回，興味深いことに S2 細胞の主要な CL 分子種はこれらの先行研究とは対照的に C18：2 ではなく一価不飽和脂肪酸（C16：1 もしくは C18：1）を 4 つ含んでおり，C18：2 を含有した CL 分子は S2 細胞におけるミトコンドリア呼吸活性には必須でないことが想定された．また，S2 細胞は Δ9 脂肪酸不飽和化酵素を DESAT1 しか発現していない上に，細胞外から血清由来の脂肪酸を取り込む能力が低いため，リン脂質のアシル鎖に C18：2 を殆ど含有していない（Matsuo et al., 2019）．これらの観察から，S2 細胞は適切なミトコンドリア機能の制御において必須な脂肪酸を細胞外環境からの取り込みには依存せず新規合成のみで賄えることが窺える．また，ミトコンドリアリン脂質の組成は内膜と外膜で異なっており，内膜では CL 分子種が豊富であることが知られている（Paradies et al., 2014）．DESAT1 阻害は PC・PE 分子種と同様に CL 分子種のアシル鎖組成に影響していたことから，DESAT1 はミトコンドリア内膜のリン脂質組成の制御に関与することが強く示唆された．また，低温曝露や DESAT1 の過剰発現はミトコンドリア呼吸活性を上昇させた一方で，単に培養培地に一価不飽和脂肪酸を添加したのみではこのような効果は見られなかった．この結果と，DESAT1 はミトコンドリアに近接した ER 膜に局在することを併せて考慮すると，DESAT1 は ER とミトコンドリアのコンタクトサイト（接触場）に局在し，ミトコンドリアに効率よく不飽和脂肪酸を供給していることが想定される．以上，DESAT1 を介する不飽和脂肪酸合成はミトコンドリア呼吸活性を細胞自律的に制御し細胞内温度を調節することに適していると考えられた．

6．今後の展望

従来，ミトコンドリア熱産生の機構や生理的意義については，褐色脂肪細胞を含む，特異な熱産生機構を有するごく一部の細胞種で研究されてきた（Bal et al., 2012; Cannon and Nedergaard, 2004; Ikeda et al., 2017）．一方で，今回我々は熱産生に特化していない細胞において膜脂質を介する細胞内温度の制御機構を同定した．さらに，低温曝露下におけるミトコンドリア膜電位の細胞自律的な上昇は，ヒト由来の iPS 細胞より分化した培養神経細胞でも観察されている（Ou et al., 2018）．他生物種におけるさらなる解析は必要であるが，我々による研究成果は細胞内温度制御の骨組みを示したと考えられる．

我々が見出した細胞レベルでの温度調節メカニズムは，個体レベルでの体温調節と如何なる関係にあるのだろうか．生物は自身の体温を自律的体温調節と行動性体温調節により制御していることがよく知られている（Morrison and Nakamura, 2019）．自律性体温調節は不随意の自律的生理反応によるものであり，発汗や血管の収縮，非ふるえ熱産生，ふるえ熱産生が具体例として挙げられる．一方，行動性体温調節は随意の本能行動による体温調節メカニズムであり，至適温度環境への移動や衣類の着脱等により達成される．外温動物であるショウジョウバエにおいては，主にこの行動性体温調節によって体温が調節されている．我々は，これまでに人工的に作り出した温度勾配上でのショウジョウバエ 3 令幼虫の選好温度を指標として，行動性体温調節の分子メカニズムの解析を行なってきた．例えば，哺乳動物における肝臓と脂肪組織の機能を併せ持つ脂肪体における DESAT1 の発現を抑制すると，ショウジョウバエ個体の選好温度が高温側へシフトすることを見出している

（Suito et al., 2022）．この結果は DESAT1 の発現抑制による体温の低下を直接示すものではないが，個体レベルの体温調節に DESAT1 を介する膜脂質の制御が関与することを強く示唆している．また，Transient Receptor Potential Ankyrin 1（TRPA1）発現ニューロン等の特定の細胞において C18：2 の含量を増加させると，温度感受性イオンチャネルの活性の変化，さらにはショウジョウバエ個体の選好温度の変化が惹起されることも明らかにしている（Suito et al., 2020）．即ち，従来，低温環境における不飽和脂肪酸含量の増加は生体膜の物理化学的な性質の制御に寄与すると考えられてきたが，我々の発見から細胞レベルでの熱産生や温度感受性イオンチャネルの制御等，多様な機序による体温制御に関わる可能性が示されている．

今回の我々の研究では，ショウジョウバエ細胞をモデルとした解析により Δ9 脂肪酸不飽和化酵素依存的な細胞内温度メカニズムが同定された．その一方で，本メカニズムの構成因子は広い生物種の細胞に存在している．例えば，哺乳類における主要な Δ9 脂肪酸不飽和化酵素ホモログである SCD1 は生体内にてユビキタスに発現し，不飽和脂肪酸生合成の中心を担う分子である．つまり，今回示されたような Δ9 脂肪酸不飽和化酵素依存的なミトコンドリア熱産生の制御は，ショウジョウバエ細胞のみならず哺乳動物細胞を含む幅広い細胞種における低温適応に寄与する可能性がある．しかしながら，哺乳動物細胞は 1 で述べた通り生体膜脂質の組成が複雑であり，生体膜組成と細胞機能との関連を解析することが困難である．今後，ショウジョウバエ以外の生物種の細胞において，膜脂質組成全体を注意深く観察しながら Δ9 脂肪酸不飽和化酵素の機能を評価することができる実験系が開発された暁には，我々の発見の動物細胞における一般性が証明されることが期待できる．

参考文献

Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R.J., Balasundaram, S., Fowle, W.H., and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis. Dev Cell *12*, 793–806. 10.1016/j.devcel.2007.04.004.

Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Bombardier, E., Goonasekera, S.A., et al. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. Nat Med *18*, 1575–1579. 10.1038/nm.2897.

Brandner, K., Mick, D.U., Frazier, A.E., Taylor, R.D., Meisinger, C., and Rehling, P. (2005). Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. Mol Biol Cell *16*, 5202–5214. 10.1091/mbc.e05-03-0256.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev *84*, 277–359. 10.1152/physrev.00015.2003.

Chretien, D., Benit, P., Ha, H.H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y.T., Jastroch, M., Jacobs, H.T., Rustin, P., and Rak, M. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 degrees C. PLoS Biol *16*, e2003992. 10.1371/journal.pbio.2003992.

Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S., Lamperti, C., Viscomi, C., Scorrano, L., and Zeviani, M. (2015). Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. Cell Metab *21*, 845–854. 10.1016/j.cmet.2015.04.016.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 870–879. 10.1038/nrm2275.

Duncan, A.L., Robinson, A.J., and Walker, J.E. (2016). Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, 8687–8692. 10.1073/pnas.1608396113.

Fedorenko, A., Lishko, P.V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. Cell *151*, 400–413. 10.1016/j.cell.2012.09.010.

Formosa, L.E., and Ryan, M.T. (2018). Mitochondrial OXPHOS complex assembly lines. Nat Cell Biol *20*, 511–513. 10.1038/s41556-018-0098-z.

Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S., and Inada, N. (2015). A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. PLoS One *10*, e0117677. 10.1371/journal.pone.0117677.

Hoch, F.L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. Biochim Biophys Acta *1113*, 71–133. 10.1016/0304-4157(92)90035-9.

Holthuis, J.C., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. Nature *510*, 48–57. 10.1038/nature13474.

Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J.P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., et al. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. Nat Med *23*, 1454–1465. 10.1038/nm.4429.

Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. Biochim Biophys Acta Biomembr *1859*, 1156–1163. 10.1016/j.bbamem.2017.03.013.

Joshi, A.S., Thompson, M.N., Fei, N., Huttemann, M., and Greenberg, M.L. (2012). Cardiolipin and mitochondrial

phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *287*, 17589–17597. 10.1074/jbc.M111.330167.

Kato, H., Sakaki, K., and Mihara, K. (2006). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. J Cell Sci *119*, 2342–2353. 10.1242/jcs.02951.

Kiyonaka, S., Kajimoto, T., Sakaguchi, R., Shinmi, D., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Imamura, H., Yoshizaki, T., Hamachi, I., Morii, T., and Mori, Y. (2013). Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. Nat Methods *10*, 1232–1238. 10.1038/nmeth.2690.

Los, D.A., and Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta *1666*, 142–157. 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.

Matsuo, N., Nagao, K., Suito, T., Juni, N., Kato, U., Hara, Y., and Umeda, M. (2019). Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in Drosophila. J Lipid Res *60*, 1199–1211. 10.1194/jlr.M090779.

Minkler, P. E., and Hoppel, C. L. (2010). Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Lipid Res *51*, 856–865. 10.1194/jlr.D002857.

Morrison, S., and Nakamura, K. (2019). Central mechanisms for thermoregulation. Annual review of physiology *81*, 285–308.

Murakami, A., Nagao, K., Juni, N., Hara, Y., and Umeda, M. (2017). An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of Δ9-desaturase in Drosophila. J Biol Chem *292*, 19976–19986. 10.1074/jbc.M117.801936.

Murakami, A., Nagao, K., Sakaguchi, R., Kida, K., Hara, Y., Mori, Y., Okabe, K., Harada, Y., and Umeda, M. (2022). Cell-autonomous control of intracellular temperature by unsaturation of phospholipid acyl chains. Cell Reports *38*, 110487.

Nagao, K., Murakami, A., and Umeda, M. (2019). Structure and Function of Delta9-Fatty Acid Desaturase. Chem Pharm Bull (Tokyo) *67*, 327–332. 10.1248/cpb.c18-01001.

Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. *291*, 707–713. 10.1006/bbrc.2002.6507.

Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., and Uchiyama, S. (2012). Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. Nat Commun *3*, 705. 10.1038/ncomms1714.

Ou, J., Ball, J.M., Luan, Y., Zhao, T., Miyagishima, K.J., Xu, Y., Zhou, H., Chen, J., Merriman, D.K., Xie, Z., et al. (2018). iPSCs from a Hibernator Provide a Platform for Studying Cold Adaptation and Its Potential Medical Applications. Cell *173*, 851–863.e816. 10.1016/j.cell.2018.03.010.

Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. Biochim Biophys Acta *1837*, 408–417. 10.1016/j.bbabio.2013.10.006.

Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Korner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., et al. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. J Cell Biol *185*, 1047–1063. 10.1083/jcb.200811099.

Rahbani, J.F., Roesler, A., Hussain, M.F., Samborska, B., Dykstra, C.B., Tsai, L., Jedrychowski, M.P., Vergnes, L., Reue, K., Spiegelman, B.M., and Kazak, L. (2021). Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat. Nature *590*, 480–485. 10.1038/s41586-021-03221-y.

Suito, T., Nagao, K., Kai, M., Juni, N., Sokabe, T., and Umeda, M. (2022). Measurement of Thermoregulatory Behavior in Drosophila melanogaster. In Behavioral Neurogenetics, (Springer), pp. 77–91.

Suito, T., Nagao, K., Takeuchi, K., Juni, N., Hara, Y., and Umeda, M. (2020). Functional expression of Δ 12 fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviour in Drosophila. Scientific reports *10*, 1–17.

Sun, Y., Rahbani, J.F., Jedrychowski, M.P., Riley, C.L., Vidoni, S., Bogoslavski, D., Hu, B., Dumesic, P.A., Zeng, X., Wang, A.B., et al. (2021). Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. Nature *593*, 580–585. 10.1038/s41586-021-03533-z.

Tatzer, V., Zellnig, G., Kohlwein, S.D., and Schneiter, R. (2002). Lipid-dependent subcellular relocalization of the acyl chain desaturase in yeast. Mol Biol Cell *13*, 4429–4442. 10.1091/mbc.e02-04-0196.

Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., and Cossins, A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. Science *271*, 815–818. 10.1126/science.271.5250.815.

Uto, Y., Ogata, T., Kiyotsuka, Y., Miyazawa, Y., Ueno, Y., Kurata, H., Deguchi, T., Yamada, M., Watanabe, N., Takagi, T., et al. (2009). Novel and potent inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. Part II: Identification of 4-ethylamino-3-(2-hydroxyethoxy) -N-[5-(3-trifluoromethylbenzyl) thiazol-2-yl] benza mide and its biological evaluation. Bioorg Med Chem Lett *19*, 4159–4166. 10.1016/j.bmcl.2009.05.123.

Varanita, T., Soriano, M.E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., Menabo, R., Costa, V., Civiletto, G., Pesce, P., et al. (2015). The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. Cell Metab *21*, 834–844.

10.1016/j.cmet.2015.05.007.
Zhou, J., Del Rosal, B., Jaque, D., Uchiyama, S., and Jin, D. (2020). Advances and challenges for fluorescence nanothermometry. Nature methods *17*, 967–980.

低温科学 81 （2023） 37–49
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 37

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

山内　彩加林[1)]，津田　栄[2)]

2023 年 2 月 3 日受付，2023 年 2 月 8 日受理

一部の生物は氷点下にもなる低温環境に生息し，凍結や低体温のリスクに晒されるにも関わらず，生命活動を維持することができる．なぜこれらの生物は凍結障害や低温障害を受けずに生命活動を維持できるのだろうか？　不凍タンパク質（Antifreeze protein：AFP）は寒冷な環境に生息する様々な魚類・昆虫・植物・微生物等で見出される低温適応タンパク質の 1 つである．AFP は氷に結合しその成長を抑制する機能（氷結晶結合機能）と，細胞膜に結合し低温障害から細胞を保護する機能（細胞保護機能）を有する．AFP の両機能は低温下におけるこれら生物の生命維持に重要な役割を果たすと考えられている．本稿では，昆虫由来 AFP を中心に，AFP の氷結晶結合機能と細胞保護機能について紹介する．

The ice-binding and cell-protection function of insect-derived antifreeze protein

Akari Yamauchi[1] and Sakae Tsuda[2]

Some organisms can be alive in cold environment even below 0℃, in spite of the risk of freezing and hypothermia. How are these organisms able to maintain their life without freezing injury and cold damage? Antifreeze proteins (AFPs) are one of cryoprotective proteins found in various cold-adapted fish, insects, plants, and microorganisms living in cold environments. AFPs can bind to single ice crystal and inhibit its growth (ice-binding function). Moreover, AFPs can prolong the life-time of mammalian cells at low temperature through its binding to lipid bilayer (cell-protection function). Both functions of AFPs are thought to play important roles in sustaining the life of these organisms at low temperatures. In this paper, we introduce the ice-binding and cell-protection functions of insect-derived AFP.

キーワード：低温適応，不凍タンパク質，熱ヒステリシス，細胞保護，オオクワガタ
Cold-adaptation, antifreeze protein, thermal hysteresis, cell-protection, *Dorcus hopei binodulosus*

1．はじめに

不凍タンパク質（Antifreeze protein：AFP，氷結晶結合タンパク質とも呼ばれる）は，低温環境に生息する魚類，昆虫，植物，バクテリア，菌類等から見出されている低温適応タンパク質の 1 つである（Davies, 2014;

連絡先
山内　彩加林
北海道大学低温科学研究所　生物環境部門　冬眠代謝生理発達分野
〒060–0819　北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011–706–5490
e-mail：a.yamauchi@lowtem.hokudai.ac.jp
1）北海道大学低温科学研究所　生物環境部門　冬眠代謝生理発達分野
Institute of low temperature science, Environmental biology division, Hibernation metabolism, physiology, and development Group
北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
（Kita 19, Nishi 8, kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060–0819, Japan）
2）東京大学新領域創成科学研究科
〒277–0882　千葉県柏市柏の葉 6–2–3 東大柏 II キャンパス　産総研イノベ棟 2109 室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The university of Tokyo, 2109 AIST innovation bldg., 6–2–3 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277–0882, Japan

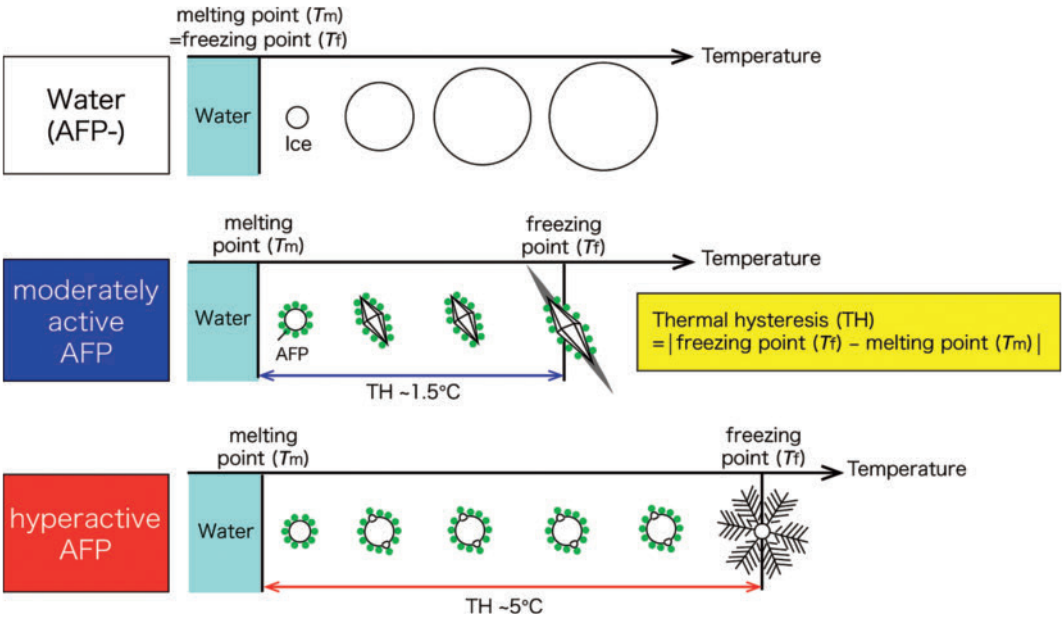


図 1：不凍タンパク質の氷結晶結合機能．
AFP 非存在・存在下の過冷却水中に生成する単結晶氷の形状および TH を示す．TH は凝固点（T_f，氷結晶が急激に成長し始める温度）と融点（T_m，氷結晶が融解し始める温度）の差を指す．（上段）純水 /AFP 不含の溶液：過冷却水中に生成する単結晶氷を顕微鏡下で観察すると，円盤状の氷結晶が観察される．T_m と T_f は同じ値であり，冷却すると氷結晶はすぐに大きく成長する．（中段）中活性型 AFP：中活性型 AFP（主に魚類 AFP）存在下では，バイピラミッド型の氷結晶が観察される．約 1.5℃の範囲で氷結晶の成長を抑制する．（下段）高活性型 AFP：高活性型 AFP は氷結晶の成長を抑制できる温度範囲が広く，μM 濃度で 2℃～7℃の TH 活性を有する．例えば昆虫 AFP 存在下の過冷却水中にはレモン型の氷結晶が観察される．

Voets et al., 2017）．AFP は 0℃以下でも凍らない水，すなわち過冷却水中に生じる単結晶氷に結合し，その成長を抑制することにより溶液の凝固点を降下させる氷結晶結合機能を有する（DeVries & Wohlschlag, 1969）（図 1）．

AFP は生物種ごとに異なる先祖タンパク質が何度も変異を繰返すうちに氷結晶結合能を獲得するよう進化（収斂進化）したと考えられている（Graham et al., 2022）．そのため，各生物種の AFP はアミノ酸配列・3 次元構造・分子量・氷結晶結合部位・氷結晶結合機能が大きく異なる（Davies, 2014）（津田の稿参照）．氷結晶結合機能の相違は，1）結合する単結晶氷の面，2）氷結晶の形状修飾能，3）熱ヒステリシス活性等が挙げられる．以下簡単に説明する．

1）結合する単結晶氷の面：単結晶氷を構成する面は基底面・第 1 プリズム面・第 2 プリズム面・ピラミダル面が代表的であるが（Mahatabuddin & Tsuda, 2018; Hew & Yang, 1992; Olijve et al., 2016），これらのうちどの氷結晶面を認識するのかは AFP ごとに異なる（Rahman et al., 2019）．全ての氷結晶面に結合できる AFP は，氷結晶のどの面からの成長も抑制できるため，氷結晶結合機能は強いことが多い．

2）氷結晶の形状修飾能：AFP は結合する氷結晶面を反映した，単結晶氷の形状修飾を行う（Basu et al., 2014; Takamichi et al., 2009; Scotter et al., 2006）．例えば，AFP を含まない溶液中の単結晶氷は円盤型を呈するが，AFP を含む溶液中の単結晶は，AFP が一部の結晶面に結合する場合はバイピラミッド型（Takamichi et al., 2009），全ての結晶面に結合する場合はレモン型を呈する（Scotter et al., 2006）．

3）熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis：TH）活性：AFP は単結晶氷に結合し，その融点を変えずに凝固点のみを降下させる．AFP の不凍活性指標として，TH 活性が用いられる．TH は，単結晶の融点（氷結晶が溶け始める温度）から凝固点（氷結晶が急激に成長する温度）を差し引いた値であり，融点と凝固点の差を示した値である．例えば，TH 活性＝ 3℃の AFP は，融点が 0℃の時，－3℃まで氷の成長を抑制できることを意味する．AFP は TH 活性を指標に，中活性型（mM 濃度の AFP 存在下で TH 活性が 2℃以下）・高活性型（μM 濃度の AFP 存在下で TH 活性が 2℃以上）に大きく分類される（Scotter et al., 2006; Celik et al., 2010; Barrett, 2001; Takamichi et al., 2007）．

上記の物理的特性の違いに加えて，AFP はアミノ酸配列が僅かに異なる分子（アイソフォーム）が複数存在

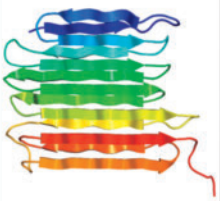
	*Tm*AFP	*Cf*AFP (SbwAFP)	*Ri*AFP	*Sf*AFP
立体構造				
モチーフ配列	TCT	TxT (x is variable)	TxTxTxT	Repetitive Glycine-rich
特徴	Mw= 8.4-12 kDa TH_{max}=5.5℃ Whole-plane	Mw= 9 kDa TH_{max}= >3℃ Basal and primary prism planes	Mw= 13 kDa TH_{max}=6.5℃ Whole-plane	Mw= 6.5 kDa TH_{max}=4.1℃ Whole-plane
生物種	**甲虫類** *Tenebrio molitor* *Dendroides canadensis* *Anatolica polita* *Microdera punctipennis*	**蛾** *Choristoneura fumiferona*	**カミキリムシ** *Rhagium inquisitor* **蛾** *Campaea perlata*	**ユキノミ** *Hypogastrura harveyi* *Granisotoma rainieri*

図 2：各種無脊椎動物（昆虫）AFP の構造.
代表的な 4 種類の無脊椎動物 AFP について，立体構造・モチーフ配列・特徴・同じタイプの AFP を発現する生物種の例を示す．甲虫 *Tenebrio molitor* 由来 *Tm*AFP（PDB code: 1EZG），蛾 *Choristoneura fumiferan* 由来 *Cf*AFP（PDB code: 1M8N），カミキリムシ *Rhagium inquisitor* 由来 *Ri*AFP（PDB code: 4DT5），トビムシ *Hypogastrura harveyi Folsom* 由来 *Sf*AFP（PDB code: 2PNE）．これらの無脊椎動物 AFP は高活性型 AFP に分類される．

する．異なる生物種では AFP のアイソフォーム数が異なるとともに，同種が有する各アイソフォームの氷結晶結合機能も異なる（Takamichi et al., 2009）．さらに，魚類 AFP は氷結晶だけでなく，細胞の脂質二重膜にも結合し，細胞を低温障害から保護するという，氷結晶結合機能だけでは説明がつかない細胞保護機能に関する報告もある（Rubinsky et al., 1990）．本稿では，こうした AFP が有する氷結晶結合機能と細胞保護機能について，近年我々が発見した昆虫 AFP に関する知見を基に紹介する．

2．無脊椎動物（昆虫）由来不凍タンパク質の構造

無脊椎動物由来の AFP はその多くが高活性型であり，厳しい寒冷環境に生息する宿主の生存に重要と考えられている（Graether & Sykes, 2004）．これまで甲虫（革質化した堅い前翅（まえばね）が背中を覆っている昆虫）・蛾・カミキリムシ・トビムシ等で AFP の発現が確認された．ここでは，既報の無脊椎動物 AFP について構造的特徴とともに紹介する（図 2）．

昆虫 AFP は 1997 年にチャイロコメノゴミムシダマシの幼虫（ミールワーム，*Tenebrio molitor*）で初めて確認された（Graham et al., 1997）．チャイロコメノゴミムシダマシは夜間に −5℃ 以下の気温となる砂漠地帯に生息する甲虫である（Duman, 1982）．チャイロコメノゴミムシダマシ由来の *Tm*AFP は 9 つのアイソフォーム（Mw = 8.4–12 kDa）が存在し，いずれも 12 残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx，x は任意のアミノ酸配列）の 7〜11 回の繰返しからなる右巻き β らせん構造を有する（Duman & Newton, 2020）．*Tm*AFP の有する Thr-Cys-Thr（TCT）モチーフは氷結晶結合部位を形成すると考えられている（詳しくは本稿 3 章を参照）．TCT モチーフを有するタイプの AFP は他の 3 種類の甲虫類でも確認された（*Dendroides canadensis, Anatolica polita borealis, Microdera punctipennis dzungarica*）（Duman et al., 1998; Ma et al., 2009; Qui et al., 2010）．また，北米やカナダに生息する蛾であるトウヒノシントメハマキ（spruce budworm, *Christoneura fumiferana*）由来の *Cf*AFP（SbwAFP，Mw = 9 kDa）は，*Tm*AFP と似た Thr-X-Thr（TXT，X は任意のアミノ酸）モチーフを有し，15 残基の繰返し配列からなる左巻き β ストランド構

造を有する（Tyshenko et al., 1997; Graether et al., 2000; Liou et al., 1999; Liou et al., 2000）．カミキリムシの一種である *Rhagium inquisitor* はヨーロッパ全域やシベリアの極寒地に生息し，トウヒやマツ等の枯れた枝や切り株の樹皮の下で越冬する（Zachariassen & Husby, 1982; Kristiansen et al., 1999）．*Rhagium inquisitor* が発現する *Ri*AFP（Mw = 13 kDa）は，平坦なβらせん構造からなる（Kristiansen et al., 2011）．*Ri*AFP は Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr（TXTXTXT）モチーフを含む 13 残基の配列が 6 回繰返されており，2 列のβシート構造が薄い板状に張り合わされた構造を有する．*Ri*AFP は 100 μM よりも低い濃度で 6.5℃という非常に高い TH 活性を示し，AFP の中でも活性が極めて高い分子として知られる．また，尺蛾（*Campaea perlata*）の幼虫（シャクトリムシ, inchworm）も *Ri*AFP と同じタイプの AFP（IwAFP, Mw = 3.5–8.3 kDa）を発現する（Lin et al., 2011）．

昆虫に近縁な種とされるトビムシからも AFP が発見されている．トビムシは腹部の跳躍器によりよく飛び跳ねる性質を有し（跳び虫），特に冬の雪上で観察される種はユキノミ（snow flea, *Hypogastrura harveyi Folsom*）として知られる．ユキノミは分子量の異なる 2 つの AFP アイソフォーム（*Sf*AFP, Mw = 6.5 kDa・15.7 kDa）を発現する（Graham & Davies, 2005）．6.5 kDa のアイソフォームは 6 つの逆並行左巻きポリプロリン II（PPII）ヘリックス構造を有しており，親水性部位と疎水性部位が逆方向を向いた構造をとる（Pentelute et al., 2008）．また，15.7 kDa のアイソフォームも同様の構造を有すると予測されている（Mok et al., 2010）．*Sf*AFP には TXT モチーフが存在しない代わりに Gly に富んだアミノ酸配列を有し，TH 活性は 5.8℃と高い値を示す．また最近，北海道に生息するユキノミ（*Granisotoma rainieri*）も Gly に富んだ配列を有する *Gr*AFP を発現することが報告された（Scholl et al., 2021）．X 線結晶構造解析の結果から，*Gr*AFP はヘリックスバンドル構造であり，その構造は *Sf*AFP に似ているものの，ヘリックスの数が 6 ではなく 9 つである点が異なることが示された．

3．越冬昆虫オオクワガタ由来 AFP

既報の高活性型昆虫 AFP の多くは北米やシベリアなどの極低温環境に生息する種から発見されたものである．一方で，日本も冬季には 0℃以下の低温となる環境であり，多くの越冬昆虫が生息する．例えば，冬の北海道における越冬昆虫を調べた研究では，甲虫類，ハチ類，蛾類，ハエやアリが越冬するという報告がある（Asahina & Ohyama, 1969）．これら越冬昆虫の中で最も確認された種は甲虫類であり，甲虫類は雪の降り積もった木の根株で越冬することが確認された．しかしながら意外にも，日本産越冬昆虫の AFP についての報告はほとんどない．そこで我々は，日本全国に生息する代表的な越冬甲虫であるオオクワガタ（*Dorcus hopei binodulosus*）に着目し，その AFP 探索と機能解析を試みた（Arai et al., 2021）．

オオクワガタは一般家庭でもペットとしての人気が高く，その飼育方法が確立しており，研究室内で繁殖させることも比較的容易である．オオクワガタは，卵→ 1 齢（初齢）幼虫→ 2 齢幼虫→ 3 齢（終齢）幼虫→蛹→成虫という成長過程を辿る．一般に，オオクワガタは夏に交配し，秋になると雌がコナラ等の朽ち木をかじり，穴を作ってそこに産卵する．我々はオオクワガタの雌雄を購入しペアリング後，コナラの朽ち木を入れたケージで雌を飼育し，51 個の卵を得ることに成功した．卵は産卵から約 1 カ月後に孵化し，体長数 mm サイズの 1 齢幼虫が生まれた．1 齢幼虫は自身の周囲にある木を食餌として食べて成長し，約 1 カ月後に体長 25 mm 程度の 2 齢幼虫へと成長した．この 2 齢幼虫を菌糸瓶に入れて 25℃で 2 か月間飼育し終齢幼虫になるまで飼育した．オオクワガタは幼虫期の大半を終齢幼虫として過ごし，終齢幼虫のまま越冬することが知られる．我々は，オオクワガタの終齢幼虫において AFP が発現しているか否かを調べることにした．

ある生物が AFP を発現しているかどうかはその体液/血液中に観察される氷結晶の形状および TH 活性を確認することで判断できる．我々はまず，オオクワガタの終齢幼虫を 25℃，10℃および 4℃に設定したインキュベーターに入れ 2 か月間飼育後，各幼虫の体液を回収した．各幼虫の体液を温度調節機能付き光学顕微鏡のステージ上にセットし，−20℃まで冷却し完全に凍結させた後，少しずつ昇温し，視野内に 1 つの単結晶氷を作成し観察した．その結果，10℃および 4℃で低温馴化させた幼虫の体液中にはレモン型の氷結晶が観察された（Arai et al., 2021）．特に 10℃で低温馴化させた幼虫の体液の TH 活性は約 4℃であり最も高かった．TH 活性の強さは AFP の濃度に依存することから（Kristiansen & Zachariassen, 2005），10℃で低温馴化させた幼虫は高濃度の AFP を含むことが示唆された．オオクワガタは雪の降り積もった木の根株で越冬することが知られるが，その木の根株の温度は −5℃にもなる（Asahina & Ohyama, 1969）．オオクワガタの越冬における AFP の

役割について知見を得るため，10℃で飼育した幼虫（AFPを発現させた幼虫）を−5℃および−10℃の冷凍庫で1日保存し，室温に戻した後の回復率を確認した（図3A）．−5℃で保存した幼虫は10匹中10匹が凍結せず，室温に戻した後も活発に動き回ることが確認された．一方，−10℃で保存した幼虫（10匹/10匹）は全て凍結し生き返ることはなかった．また，幼虫の体表面を水で軽く濡らし凍結を起こりやすくした（植氷，宇高の稿参照）条件で，−5℃で保存した幼虫（3匹/3匹）も凍結死した．昆虫には凍結を回避し越冬する凍結回避型と，凍結しても死なずに越冬できる耐凍型のものがいる（Zachariassen & Kristiansen, 2000; Duman, 2001; Vrielink et al., 2016）（泉の稿参照）．我々の結果は，オオクワガタは季節的な外気温低下に伴い越冬に備えてAFPを発現し，体液中にAFPを初めとする凍結保護物質を蓄積することにより越冬を可能にする凍結回避型昆虫ということを示唆する．

続いて，オオクワガタが発現するAFPのアミノ酸配列情報を取得するために，cDNAライブラリを構築した．既報の昆虫AFPのアミノ酸配列を参考に，オオクワガタのAFPを探索した結果，12残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx）の繰返しからなるタンパク質が発見された（以下，*Dhb*AFPとする）．*Dhb*AFPは12残基のアミノ酸配列の繰返し回数が異なる，少なくとも6種類のアイソフォーム（*Dhb*AFP1-6）の存在が示唆された．*Dhb*AFPとチャイロコメノゴミムシダマシ由来*Tm*AFPのアミノ酸配列を比較した結果，どのアイソフォームも82%以上の相同性を示した．さらに*Dhb*AFPが不凍活性を有するかを確認するために，*Dhb*AFPの大腸菌発現系を構築し，各種クロマトグラフィーにより組換え*Dhb*AFPを精製した．組換え*Dhb*AFPは150 μM濃度で約3℃のTH活性を示し，単結晶氷の全ての面（プリズム面，ピラミダル面，基底面）に結合することが確認された．これらの氷結晶結合機能は，高活性型AFPである*Tm*AFPの特徴とよく一致した（Liou et al., 2000; Basu et al., 2014）（本稿，1章と2章参照）．以上より，日本産越冬昆虫であるオオクワガタのAFPのアミノ酸配列を同定し，*Dhb*AFPが高活性型AFPであることが明らかとなった（Arai et al., 2021）．

*Dhb*AFPの氷結晶結合メカニズムに関する知見を得るために，*Tm*AFPのX線結晶構造データを元に*Dhb*AFPのモデル構造を構築した（図3B）．*Dhb*AFPは（TCTxSxNCxxAx）で1巻きする，βシートがらせん状に積み重なった右巻きβらせん構造を示した（図3C）．*Dhb*AFPは四角柱状の外形を呈しており，TCTモチーフが7列連なる規則性に富んだ面の中央には長い溝が確認された．*Tm*AFPの結晶構造解析の結果では，この長い溝に水和水が直線状に配置することが報告されている（Liou et al., 2000）．またTCTモチーフのThr側鎖のOH基は直線状に配置しているため，*Tm*AFPの分子表面には水分子とOH基が3列に規則的に配置し，平面性の高い分子表面を構成する（Graether & Sykes, 2004）．これらの整列した水分子とOH基の酸素原子（O原子）の配置は，単結晶氷の基底面やプリズム面を構成する水分子（O原子）の配置と完全に一致する（Liou et al., 2000）．これまでの複数の既報から，AFPは自身の分子表面に宿した氷様の水分子（単結晶氷と配置の一致する

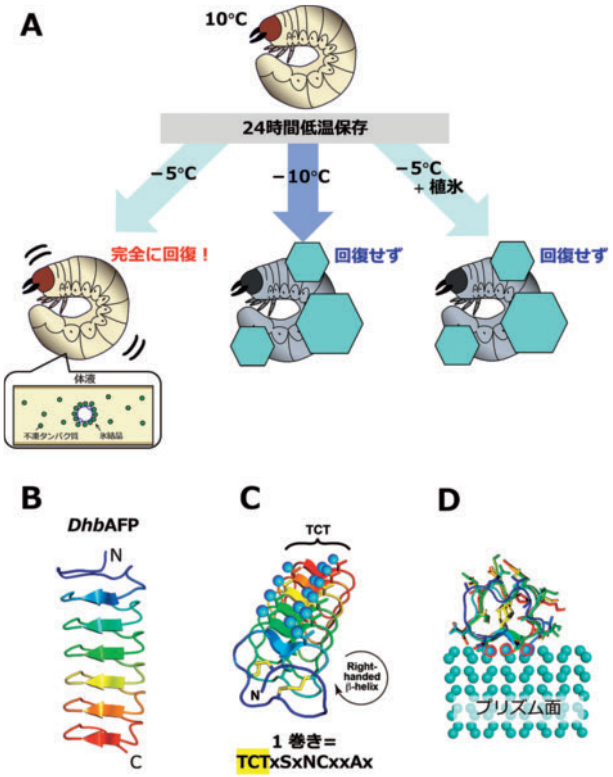


図3：オオクワガタAFP（*Dhb*AFP）の氷結晶結合機能．（A）オオクワガタ*Dorcus hopei binodulosus*終齢幼虫の−5℃下1日保存実験．低温馴化（10℃，2か月）によりAFPを体液中に発現したオオクワガタの終齢幼虫は，−5℃下で1日保存しても凍結死せず，室温に戻すと完全に回復する．−10℃および−5℃＋植氷条件下ではオオクワガタは凍結死する．オオクワガタはAFPにより凍結を回避し越冬すると考えられる．（B）*Dhb*AFPのモデル構造．（C）*Dhb*AFPのTCTモチーフ．12残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx）で一周する右巻きβらせん構造を有する．水色の球はOH基および水分子のO原子を示す．TCTモチーフにはThr側鎖のOH基（両端）と中央の長い溝の水分子が3列に規則的に並ぶ．（D）*Dhb*AFPの氷結晶結合メカニズムの模式図．3列に規則的に並んだ水分子（O原子）は氷結晶を構成する水分子（O原子）の配置と一致する．*Dhb*AFPモデル構造構築には*Tm*AFP（PDB code: 1EZG）をテンプレートとして使用．Arai et al., 2021を一部変更して引用．

水分子）を介して，氷結晶に結合すると考えられている（Garnham et al., 2011; Chakraborty & Jana, 2018; Yamauchi et al., 2020）．*Dhb*AFP は *Tm*AFP とアミノ酸配列（相同性は 85％以上）・氷結晶結合機能（結合する結晶面や TH 活性）が非常によく似ていた．これらを考え合わせると，*Dhb*AFP は *Tm*AFP と同様に，TCT モチーフをもつ分子表面が氷結晶結合部位であり，その分子表面に宿した高度に組織化された氷様の水分子を介して，氷結晶に結合しその成長を極めて強く抑制すると考えられる（図 3D）．

4．AFP の細胞保護機能

低温は生物を凍結の危機に晒すだけでなく，凍結せずとも細胞に障害を与える可能性がある．特に，哺乳動物は体温が 37℃付近に維持される恒温動物であり，低体温下で長時間生存することは困難である．その組織や細胞はそれより低い低体温に長時間陥ると，様々な低温誘導性障害を生じるためである．哺乳動物細胞で生じる低温誘導性障害（曽根の稿参照）には，脂質の過酸化，細胞膜の機能低下による制御不能なイオン漏出/流入（細胞内外イオンの恒常性の喪失），Ca^{2+} イオン流入に伴うホスホリパーゼ・プロテアーゼの活性化や細胞骨格の損傷等が挙げられる（Hochachka, 1986; R. G. Boutilier, 2001; Rubinsky, 2003; Boutilier, 2001; Qin, 2003; Sun, 2016; Nickel, 2014; Quinn, 1985）．一方，低温環境に生息する変温動物は低体温状態にもなるにも関わらず生命活動を維持できることから，その細胞が低温により障害を受けない何らかの機構を有すると考えられる．1 章で述べたように魚類由来 AFP は非凍結温度である 4℃下で哺乳動物細胞の脂質二重膜に結合して膜を安定化し，細胞の生存期間を延長できるとの報告がある（Rubinsky, 1990）．

この Rubinsky らによる AFP の細胞保護機能に関する論文では，不凍糖タンパク質（Antifreeze glycoprotein：AFGP）を添加した保存液にブタ卵母細胞を浸漬し，4℃下で 24 時間保存後の卵膜の膜電位の変化を調べた．膜電位とは細胞膜を挟んだ細胞内と外の電位差であり，細胞内外のイオンの分布の差を示す．膜電位の変化は細胞内外のイオン分布の変化を示すため，低温曝露により細胞膜機能低下に伴うイオン漏出/流入が生じたかの指標となる．同論文では，AFGP 不含の保存液で保存された卵母細胞は低温曝露後に膜電位が完全に失われたのに対し，AFGP 含有の保存液で保存された卵母細胞は通常（22℃）時の 65％の膜電位を維持することが示された．この結果から，AFGP は低温下で生じる卵母細胞の膜損傷を防ぐことにより，細胞からのイオン流出を抑制すると考えられた．翌年，AFGP のみでなく，魚類 AFPI-III にも 4℃下における細胞保護効果が認められた（Rubinsky et al., 1991）．また電気生理学的手法により，AFPI を添加したブタ卵母細胞では K^+ イオンと Ca^{2+} イオン電流の抑制が確認されたため，AFP は K^+ チャネルに結合し K^+ イオンの流出と，Ca^{2+} チャネルに結合し Ca^{2+} イオンの流入を抑制することが示唆された（Rubinsky et al., 1992）．以上の報告から，AFP は細胞膜上のイオンチャネルと相互作用することにより，低温曝露により細胞で生じるイオン恒常性の破綻を防ぐと考えられた．

一方，Hays らは人工細胞膜であるリポソームと AFP の相互作用を報告した（Hays et al., 1996）．一般に，細胞膜は 37℃から 4℃に冷却されると，リン脂質の脂肪酸鎖が柔軟な構造である液晶相から，脂肪酸鎖同士が密接した構造であるゲル相へと相転移する（Quinn, 1985）．この脂質の相転移は膜脂質の均一な並びにズレを生じ，細胞膜から細胞内イオンの漏れを引き起こすとされる（Crowe & Crowe, 1986）．Hays らは，蛍光物質を内封したリポソームを作製し，蛍光物質の漏れが AFGP 濃度依存的に抑制され，10 mg/ml 濃度の時に完全に抑制されることを示した．AFGP はイオンチャネル等を含まない人工細胞膜においても内封物の漏れを抑制したため，脂質の相転移を防ぐという仮説が生じた．さらに 2002 年には AFPI も脂質の相転移を抑制することが示唆された（Tomczak et al., 2002）．総じて，AFP は細胞膜上のイオンチャネルあるいは脂質二重膜と相互作用し，低温曝露時に生じる細胞内イオンの漏出や細胞外イオンの流入を防ぎ，細胞のイオン恒常性の維持に寄与すると考えられた．

その後，魚類 AFP の細胞保護効果が様々な細胞・組織・臓器で調べられてきた．例えば，平野らは日本産魚類 AFPIII を用いてヒト肝がん細胞株 HepG2 に対する 4℃下での細胞保護効果を報告した（Hirano et al., 2008）．この報告では，様々な臓器の保存に利用されており，タンパク質を含まない保存液であるユーロコリンズ液（Euro-Collins，EC）液に AFPIII を 10 mg/ml となる様に溶解し，約 1 万個の HepG2 細胞をその保存液に浸漬し保存した．その結果，EC 溶液のみでは 1 日後にほぼ全ての細胞が死滅した一方，AFPIII 存在下では 3 日後も約 75％の HepG2 細胞が生存可能であった．また同論文では，細胞膜損傷の程度を評価するために，細胞から放出された乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定した．LDH は通常，細胞質に存在している酵素であるが細胞

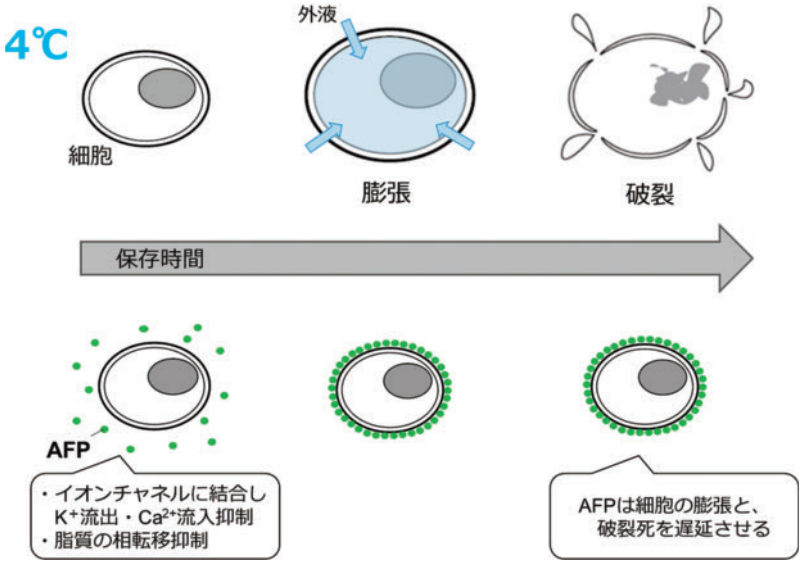


図 4：AFP の細胞保護機能.
保存液中に浸漬し 4℃保存された細胞の経時的な状態変化を示す.（上段）AFP 不含の保存液中で保存された細胞は，時間経過につれて細胞が膨張し，約 8 時間後に破裂して死滅する.（下段）AFP を含む保存液中で保存された細胞は，4℃下での生存期間が延長される．保存液中の AFP は細胞膜上のイオンチャネルや脂質二重膜に結合し細胞内イオンの漏出・細胞外イオンの流入を防ぐため，細胞の膨張・破裂の過程を遅延させると考えられる.

膜が損傷を受けると培地中に放出されるため，膜損傷を受けた細胞や死細胞数を測る指標として用いられる．AFPIII で保存された細胞は放出される LDH 量も 38%まで減少しており，AFP により細胞膜の損傷から保護されたため生存率が向上したことが示唆された．さらに平野らは，4℃保存中の 1 個の細胞を走査型電気化学顕微鏡により観察し，細胞の経時的な状態変化を報告した（Hirano et al., 2008）．EC 溶液中で 4℃保存された HepG2 細胞は，保存時間が経過するにつれ徐々に細胞が膨張し，約 8 時間後に破裂し死滅した．一方，AFPIII 存在下では，HepG2 細胞の膨張は保存開始から 16 時間後まで観察されなかった．この観察結果は，AFP が細胞の表面に結合することにより細胞の膨張とそれに引き続いて生じる破裂死を抑制し，細胞死を遅らせることを示唆した．しかしながら，AFP が細胞膜に結合している様子を観察したという報告はそれまで無かった．その 5 年後，上島らが共焦点レーザー顕微鏡により蛍光標識した AFP が HepG2 細胞およびラット膵島細胞株 RIN-5F の細胞膜表面に結合する様子を初めて報告した（Kamijima et al., 2013）．同論文は，RIN-5F 細胞に対する日本産魚類 AFPI-III および AFGP（天然物）の細胞保護効果も示した．各 AFP を 10 mg/ml になるように溶解した EC 保存液に RIN-5F 細胞を浸漬し，4℃で 1〜5 日間保存後の細胞生存率を調べた．その結果，EC 溶液で保存された細胞は 1 日後の生存率が 20%であり，3 日後にはほぼ死滅した．一方，AFP を添加した EC 溶液で保存された細胞の 1 日後の生存率は AFPI-III で 80%，AFGP で 50%であった．AFPI および III で保存された細胞は 5 日後であっても約 60%が生存可能であり，高い細胞生存率が確認された．以上の知見をまとめると，AFP は細胞膜表面に結合し，細胞内イオンの漏出・細胞外イオンの流入を抑制することにより，細胞の膨張・破裂を遅らせて，低温下での細胞の生存期間を延長すると考えられる（図 4）.

AFP の細胞保護効果は，臓器移植に用いられる保存液の改善や繁殖工学分野での応用が期待されており，これら応用を目指した基礎研究も実施されてきた．例えば，心臓は保存可能な期間が短いことで知られ，ヒトの場合 4 時間程度しか保存ができない．Amir らは，AFPI および III を用いてラットの心臓を −1.3℃下で 24〜32 時間保存する実験を実施した（Amir et al., 2004）．その結果，AFP 不含の保存液を使用した場合，心臓は凍結したが，AFP 含有の保存液で保存した場合，心臓を凍結させずに保存できた．AFPI あるいは AFPIII（15 mg/ml）はラットの心臓を −1.3℃下で 32 時間保存可能にすることが示された．さらに，Ideta らはウシの 7 日齢胚を AFPIII 含有保存液に浸漬し 4℃下で保存したところ 10 日後でも生存可能になること，AFP で 4℃保存した受精

卵を代理母に移植させたところ仔牛が誕生したことを報告した（Ideta et al., 2015）．また倉持らは，線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いて動物個体レベルでの魚類 AFPIII と微生物 AFP（南極子嚢菌由来 *Anp*AFP，雪腐病菌（担子菌）由来 *Tis*AFP8）の細胞保護効果を報告した（Kuramochi et al., 2019）．各 AFP の TH 活性の強さは *Tis*AFP8 ＞ *Anp*AFP ＞魚類 AFP である．各 AFP を体壁の筋肉に発現させた線虫を低温ショック条件（0℃・−2℃）および凍結条件（−5℃）で 1 日保存後，線虫の生存率を測定した．その結果，AFP を発現していない線虫（コントロール）の 1 日保存後の生存率は 20%（0℃），10%（−2℃），6%（−5℃）であった．一方，中活性型の魚類 AFPIII を発現させた線虫は，−5℃の凍結条件において，コントロールと比較して有意に高い生存率（19%）を示した．また，中活性型の *Anp*AFP を発現させた線虫は 1 日保存後の生存率が 50%（0℃），30%（−2℃），32%（−5℃）であり，保存温度に関わらず有意な生存率の向上が確認された．さらに，高活性型の *Tis*AFP8 を発現した線虫は，いずれの保存温度においても 1 日保存後に約 70%が生存可能であり，最も高い生存率を示した．従って，いずれの AFP も凍結条件（−5℃）下では，氷結晶の成長による細胞の破壊から線虫を保護し，線虫に耐凍性を与えると考えられる．このことは，AFP の TH 活性の強さと線虫の生存率の高さに相関が見られたことからも支持される．また，微生物 AFP は低温ショック（0℃・−2℃）条件においても線虫の生存率を向上させたことから，細胞膜を保護し低温障害から線虫を保護することが示唆された．

5．昆虫 AFP の細胞保護機能

一方，高活性型である昆虫 AFP も非凍結温度下において細胞保護機能を有するのか否かは不明のままであった．また，過冷却温度下での非凍結保存が可能であれば，氷結晶による細胞破壊を避けつつ，低温により細胞の代謝を最低限まで抑制することにより，細胞の保存期間を延長できる可能性がある（Brockbank et al., 2020）．しかしながら，過冷却温度下の非凍結条件における AFP の細胞レベルの保護効果は検討されていなかった．そこで我々は昆虫 AFP を用いて，4℃および過冷却温度下における細胞保護効果を調べた（Yamauchi et al., 2021）．

AFP の細胞保護効果を比較検討するために，魚類 AFPI-III，昆虫 *Tm*AFP，コントロールタンパク質としてウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin，BSA）の 5 種類のタンパク質を用意した．なお，AFP はいずれも天然物（アイソフォーム混合物）を使用した．これらのタンパク質を EC 溶液に対して 0.02–2.5 mM となるように溶解した保存液に RIN-5F 細胞を浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1〜20 日間保存した．保存前後の生細胞数は，死細胞を染色するトリパンブルー法により測定し，細胞生存率（保存後の生細胞数密度/保存前の生細胞数密度）を算出した．AFP の細胞保護効果の強さは保存後の細胞生存率から判断した．まず *Tm*AFP が非凍結温度（4℃）および過冷却温度（−2℃と−5℃）下において細胞保護効果を有するか調べた（図 5A）．4℃下で 1 日保存後の RIN-5F 細胞の生存率は，AFP なし（EC）の時 12%であった．また−2℃および−5℃下で保存した細胞はほぼ全て死滅した．一方，*Tm*AFP 溶液で保存した場合は，AFP の濃度に依存して RIN-5F 細胞の生存率は飽和曲線様に上昇した．そして，保存温度（4℃，−2℃，−5℃）に関わらず，*Tm*AFP 濃度が 1.5 mM 以上の時に生存率は 90%以上に達した．この結果から，昆虫 AFP も細胞保護機能を有することが明らかとなった．続いて，細胞保存に十分な濃度と判断された 1.5 mM の各 AFP を含む EC 溶液を用いて，魚類 AFP と *Tm*AFP の細胞保護効果を比較した．*Tm*AFP は魚類 AFPI-III よりも全ての保存温度（4℃，−2℃，−5℃）および保存期間（1〜20 日）において常に高い生存率を示した（図 5B）．特に *Tm*AFP を用いて−5℃で保存した RIN-5F 細胞は最も高い生存率を示し，20 日保存後の細胞生存率も 20%であった．ここで我々は保存液を検討することにより，保存後の細胞生存率をさらに向上できるのではないかと考えた．University of Wisconsin（UW）液は臓器移植に汎用される保存液の 1 つであり，EC 溶液に比較して細胞を保護するのに適する様々な物質（ATP や抗酸化物質）を含む．この UW 液に 1.5 mM となるよう *Tm*AFP を加えた溶液で，RIN-5F 細胞を−5℃下で保存したところ，20 日間保存後の生存率は 53%と極めて高い値を示した（図 5C）．以上の結果から，昆虫 AFP は魚類 AFP に比べて高い細胞保護効果を有すること，昆虫 AFP は過冷却温度域で哺乳動物細胞を長期間生存可能にすることが示された．

なぜ昆虫 AFP は魚類 AFP に比べて高い細胞保護効果を発揮できたのだろうか．昆虫 AFP の特徴は，1）分子表面に単結晶氷を構成する水分子と配置が一致するような高度に組織化された氷様の水和水を有すること，2）その結果，魚類 AFP に比べてより多くの氷結晶面に結合できること，3）2）により，あらゆる面からの氷の成長を極めて強く抑制でき過冷却状態を安定化できることが挙げられる（本稿 3 章および津田の稿参照）．興味深

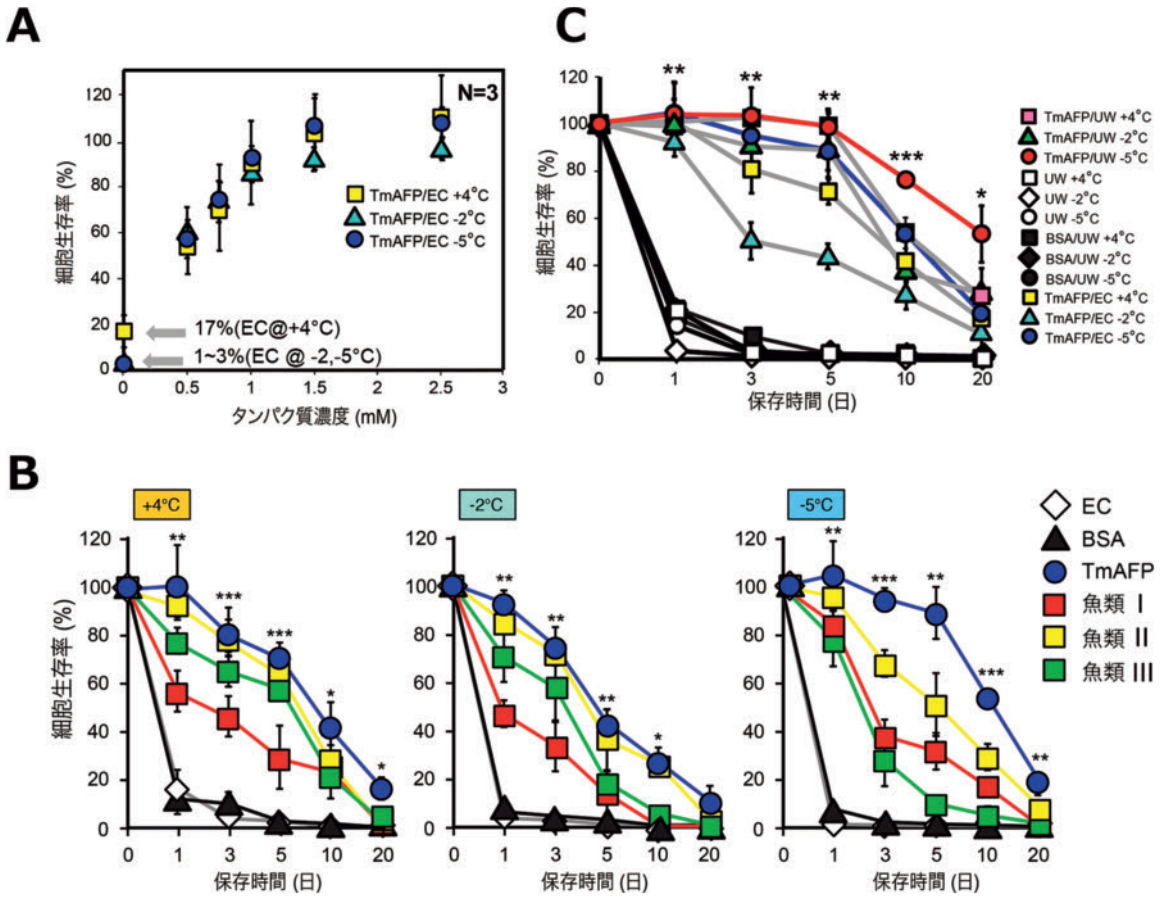


図 5：昆虫 AFP の細胞保護機能.
（A）*Tm*AFP の細胞保護効果．ラット膵島細胞株 RIN-5F 細胞を 0–2.5 mM の *Tm*AFP を含む EC 溶液に浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1 日保存後の細胞生存率を示す．*Tm*AFP は細胞保護機能を有し，その効果は 1.5 mM 以上の濃度で最大となる．（B）魚類 AFPI-III と *Tm*AFP の細胞保護機能の比較．RIN-5F 細胞を 1.5 mM のタンパク質を含む EC 溶液に浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1～20 日保存後の細胞生存率を示す．*Tm*AFP はいずれの保存温度（4℃，−2℃，−5℃），保存期間（1～20 日）においても最も高い生存率を示した．（C）*Tm*AFP 含有 UW 溶液で保存された RIN-5F 細胞の生存率．*Tm*AFP 含有 UW 溶液で −5℃保存された RIN-5F 細胞は 20 日後でも 53%が生存可能となった．EC：Euro-Collins 溶液，UW：University of Wisconsin 溶液.
*p ＜ 0.05，**p ＜ 0.01，***p ＜ 0.001．Yamauchi et al., 2021 を一部変更して引用.

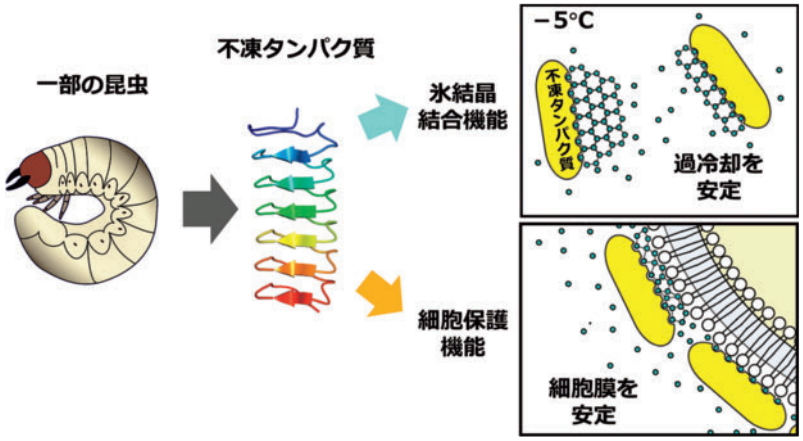


図 6：昆虫 AFP の氷結晶結合機能と細胞保護機能.
AFP は氷結晶結合機能により凍結を防ぎつつ，細胞保護機能により低温障害から細胞を保護し，寒冷地に生息する昆虫の生存に寄与すると考えられる.

いことに，シミュレーション実験により，動物細胞の細胞膜主成分であるホスファチジルコリン（PC）で構成されたモデル膜上にも，氷様の構造の水分子ネットワークが観察されている（Murzyn et al., 2006; Hsieh & Wu, 1996）．これらを考え合わせると，AFP は氷に結合するときと同様のメカニズムにより，その分子表面に宿した氷様の水和水を介して細胞膜に結合するという仮説が考えられる．昆虫 AFP はより多くの結晶面に結合可能な高活性型 AFP であるため，細胞膜上の水分子を認識しやすく細胞膜への親和性が上昇した可能性が考えられる．そして，昆虫 AFP は TH 活性が高い，すなわち氷結晶の成長を極めて強く抑制できるため，過冷却保存実験の条件（−2℃・−5℃）下では過冷却安定化に寄与したと予想される．以上より，昆虫 AFP は氷結晶結合機能により過冷却を安定化しながら，細胞膜保護機能により細胞膜を保護し低温障害から細胞を守ることにより，過冷却温度下において細胞の生存期間を延長したと推察される（図 6）．

6．おわりに

本稿では，昆虫 AFP で得られた最近の知見を中心に，AFP の氷結晶結合機能および細胞保護機能について概説した．AFP の両機能は昆虫の凍結回避や低温障害から細胞を保護する役割を果たしており，昆虫の低温環境下における生命維持に重要なことが示唆される．我々は日本産越冬昆虫の 1 つとしてオオクワガタに着目し，その AFP がオオクワガタの凍結回避に果たす役割を明らかにした．オオクワガタの他にも，日本には数多くの越冬昆虫が生息しており，それら越冬昆虫の低温適応へ AFP がどのように関与するのかについても，今後徐々に明らかにされていくだろう．また，昆虫 AFP も魚類 AFP と同様に低温下において細胞保護機能を発揮することも明らかとなった．AFP は生物種によりその立体構造が異なるにも関らず，複数種で細胞保護効果が認められる．このことは，AFP に共通する氷結晶結合特性が細胞保護効果に重要だという考えを想起させる．一方で，AFP が細胞膜のどの部位と相互作用しているのか，AFP のどのアミノ酸が細胞膜結合に関与するかの完全な同定には至っておらず，AFP-細胞膜の相互作用メカニズムを解明するためには更なる研究が必要である．AFP の構造・氷結晶結合機能と細胞保護機能にどのような関係があるのか，今後の研究のさらなる進展が望まれる．

謝辞

本研究を進めるにあたり，株式会社ニチレイ　小泉雄史氏，井上　敏文氏，石井寛崇氏から多くのご協力を賜りました．不凍タンパク質の精製は産業技術総合研究所三浦　愛氏にご協力頂きました．また本研究を進めるにあたり，近藤英昌氏，新井達也氏，佐々木祐次氏には大変お世話になりました．本研究にご協力を頂いた全ての方々に心より感謝申し上げます．

参考文献

Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B., Yousif, B.S., Lavee, J. & Smolinsky, A.K. (2004). Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. *Cryobiol*, **48**, 273–282. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.02.009

Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Nishimiya, Y., Sasaki, Y.C. & Tsuda, S. (2021). Discovery of hyperactive antifreeze protein from phylogenetically distant beetles questions its evolutionary origin. *Int J Mol Sci,* **22**(7), 3637. Doi: 10.3390/ijms22073637.

Asahina, E. & Ohyama, Y. (1969). Cold Resistance in insects wintering in decayed wood. *Low Temperature Science (Hokkaido University Library),* **27**, 143–152. http://hdl.handle.net/2115/17760.

Barrett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins. *Int J Biochem Cell Biol,* **33**, 105–117. Doi: 10.1016/s1357-2725(00)00083-2.

Basu, K., Garnham, C.P., Nishimiya, Y., Tsuda, S., Braslavsky, I. & Davies, P. (2014) Determining the ice-binding planes of antifreeze proteins by fluorescence-based ice plane affinity. *JoVE*, **83**, e51185. Doi: 10.3791/51185.

Boutilier, R.G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol*, **204**, 3171–3181. Doi: 10.1242/jeb.204.18.3171.

Brockbank, K.G.M., Duman, J.D., Chen, Z., Greene, E.D., Vu, H. M. & Campbell, L. H. (2020). Cell, tissue, and organ preservation with insect-derived antifreeze proteins. In *Antifreeze Proteins*; Ramløv, H., Eriis, D.S., Eds.; Springer Nature: Cham, Switzerland, Volume 2, pp. 261–285.

Celik, Y., Graham, L.A., Mok, Y.F., Bar, M., Davies, P.L. & Braslavsky, I. (2010). Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 5423–5428. Doi: 10.1073/pnas.0909456107.

Davies, P. L. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem Sci*, **39**, 548–555. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.09.005.

Davies, P. L. (2017). Ice-binding proteins: A remarkable

diversity of structures for stopping and starting ice growth. *TiBS*, **39**, 548–555. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.09.005

DeVries, A.L. & Wohlschlag, D.E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, **163**, 1073–1075. Doi: 10.1126/science.163.3871.1073.

Duman, J. G. (1982). Insect antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiol*, **19**, 613–627. Doi: 10.1016/0011-2240(82)90191-2.

Duman, J.G. (2001). Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annu Rev Physiol*, **63**, 327–357. Doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.327.

Duman, J. G., & Newton, S. S. (2020). Insect antifreeze proteins. In *Antifreeze Proteins Volume 1: Environment, Systematics and Evolution* (pp. 131–187). Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-030-41929-5_6.

Duman, J. G.; Verleye, N. L.-D.; Goetz, F. W.; Wu, D. W.; Andorfer, C. A.; Benjamin, T.; Parmelee, D. D. (1998). Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.* B, *168*, 225–232. Doi: 10.1007/s003600050140.

Chakraborty, S. & Jana, B. (2018). Optimum number of anchored clathrate water and its instantaneous fluctuations dictate ice plane recognition specificities of insect antifreeze protein. *J Phys Chem B*, **122**, 3056–3067. Doi: 10.1021/acs.jpcb.8b00548.

Graether, S.P.; Kuiper, M.J.; Gagné, S.M.; Walker, V.K.; Jia, Z.; Sykes, B.D.; Davies, P.L. (2000). β-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, 406, 325–328. Doi: 10.1038/35018610.

Graether, S.P. & Sykes, B.D. (2004). Cold survival in freeze-intolerant insects: The structure and function of β-helical antifreeze proteins. *Eur J Biochem*, **271**, 3285–3296. Doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04256.x.

Garnham, C. P., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2011) Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 7363–7367. Doi: 10.1073/pnas.1100429108.

Graham, L.A. & Davies, P.L. (2005). Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science*, **310**, 461. Doi: 10.1126/science.1115145.

Graham, L. A., Gauthier, S. Y., & Davies, P. L. (2022) Origin of an antifreeze protein gene in response to Cenozoic climate change. *Sci Rep*, **12**, 8536. Doi: 10.1038/s41598-022-12446-4.

Graham, L.A., Liou, Y.-C., Walker, V.K. & Davies, P.L. (1997). Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, **388**, 727–728. Doi: 10.1038/41908.

Hays, L.M., Feeney, R.E., Crowe, L.M., Crowe, J.H. & Oliver, A. E. (1996). Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 6835–6840. Doi: 10.1073/pnas.93.13.6835.

Hew, C.L. & Yang, D.S.C. (1992). Protein interaction with ice. *Eur J Biochem*, **203**, 33–42. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19824.x.

Hirano, Y., Nishimiya, Y., Kowate, K., Mizutani, F., Tsuda, S. & Komatsu, Y. (2008). Construction of time-lapse scanning electrochemical microscopy with temperature control and its application to evaluate the preservation effects of antifreeze proteins on living cells. *Anal Chem*, **80**, 9349–9354. Doi: 10.1021/ac8018334.

Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y. & Tsuda, S. (2008). Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout, Cryobiol, **57**, 46–51. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.05.006.

Hochachka, P. W. (1986). Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, **231**, 234–241. Doi: 10.1126/science.2417316.

Hsieh, C.-H. & Wu, W.-G. (1996). Structure and dynamics of primary hydration shell of phosphatidylcholine bilayers at subzero temperatures. *Biophys J*, **71**, 3278–3287. Doi: 10.1016/S0006-3495(96)79520-6

Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Hayama, K., Shirasawa, A., Sakaguchi, K., Tominaga, N., Nishimiya, Y. & Tsuda, S. (2015). Prolonging hypothermic storage (4C) of bovine embryos with fish antifreeze protein, *J Reprod Dev*, **61**, 1–6. Doi: 10.1262/jrd.2014-073.

Kamijima, T., Sakashita, M., Miura, A., Nishimiya, Y. & Tsuda, S. (2013). Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. *PLoS One*, **8**, e73643. Doi: 10.1371/journal.pone.0073643.

Kristiansen, E., Pedersen, S., Ramløv, H. & Zachariassen, K.E. (1999). Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *J Comp Physiol B*, **169**, 55e60. Doi: 10.1007/s003600050193.

Kristiansen, E., Ramløv, H., Højrup, P., Pedersen, S.A., Hagen, L. & Zachariassen, K.E. (2011). Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Insect Biochem Mol Biol*, **41**, 109–117. Doi: 10.1016/j.ibmb.2010.11.002.

Kristiansen, E. & Zachariassen, K.E. (2005). The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiol*, **51**, 262–280. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.07.007.

Lin, F.-H., Davies, P.L. & Graham, L.A. (2011). The Thr- and Ala-rich hyperactive antifreeze protein from Inchworm folds as a flat silk-like β-helix. *Biochemistry*, **50**, 4467–4478. Doi: 10.1021/bi2003108.

Liou, Y.-C., Thibault, P., Walker, V.K., Davies, P.L. & Graham, L.A. (1999). A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, **38**, 11415–11424. Doi: 10.1021/bi990613s.

Liou, Y.-C., Daley, M.E., Graham, L.A., Kay, C.M., Walker, V.K., Sykes, B.D. & Davies, P.L. (2000). Folding and structural

characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. *Protin Expr Purif*, **19**, 148–157. Doi: 10.1006/prep.2000.1219.

Liou, Y.-C; Tociij, A.; Davies, P.L.; Jia, Z. (2000). Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a β-helix antifreeze protein. *Nature*, *406*, 322–324. Doi: 10.1038/35018604.

Ma Y., Hou, F. & Ma, J. (2009). Seasonal changes in cold tolerance of desert beetle *Anatolica polita borealis* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) and their physiological mechanisms. *Acta Entomol Sin*, **52**, 372–379. Doi: 10.16380/J.KCXB.2009.04.004.

Mahatabuddin, S. & Tsuda, S. (2018). Applications of Antifreeze proteins: Practical use of the quality products from Japanese fishes. *Adv Exp Med Biol*, **1081**, 321–327. Doi: 10.1007/978-981-13-1244-1_17.

Murzyn, K., Zhao, W., Karttunen, M., Kurdziel, M. & Róg, T. (2006). Dynamics of water at membrane surface: Effect of headgroup structure. *Biointerphases*, **1**, 98–105. Doi: 10.1116/1.2354573

Mok, Y.F., Lin, F.H., Graham, L.A., Celik, Y., Braslavsky, I. & Davies, P.L. (2010). Structural basis for the superior activity of the large isoform of snow flea antifreeze protein. *Biochemistry*, **49**, 2593–2603. Doi: 10.1021/bi901929n.

Nickel, A., Kohlhaas, M. & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*, **73**, 26–33. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.011.

Olijve, L.C., Meister, K., DeVries, A.L., Duman, J.G., Guo, S., Bakker, H.J. & Voets, I.K. (2016). Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3740–3745. Doi: 10.1073/pnas.1524109113.

Pentelute, B.L., Gates, Z.P., Tereshko, V., Dashnau, J.L., Vanderkooi, J.M., Kossiakoff, A.A. & Kent, S.B. (2008). X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers. *J Am Chem Soc*, **130**, 9695–9701. Doi: 10.1021/ja8013538.

Qin, M. Hypothermic preservation of Hepatocytes. (2003). *Biotechnol Prog*, **19**, 1118–1127. Doi: 10.1021/bp025628n.

Qiu, L., Wang, Y., Wang, J., Zhang, F. & Ma, J. (2010). Expression of biologically active recombinant antifreeze protein His-MpAFP149 from the desert beetle (*Microdera punctipennis dzungarica*) in *Escherichia coli*. *Mol Biol Reports*, **37**, 1725–1732. Doi: 10.1007/s11033-009-9594-3.

Quinn, P.J. (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiol*, **22**, 128–146. Doi: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.

Sun, W., Wang, Z., Cao, J., Cui, H. & Ma, Z. (2016). Cold stress increase reactive oxygen species formation via TRPA1 activation in A549 cells. *Cell Stress Chaperones*, **21**, 367–372. Doi: 10.1007/s12192-015-0663-3.

Rahman, A.T., Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Ohyama, Y. & Tsuda, S. (2019). Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes. *Sci Rep*, **9**, 2212. Doi: 10.1038/s41598-018-36546-2.

Rubinsky, B. (2003). Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev*, **8**, 277–284. Doi: 10.1023/a:1024734003814.

Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M. & Devries, A.L. (1990). The effect of antifreeze glycopeptides on membrane-potential changes at hypothermic temperatures. Biochem Biophys Res Commun, **173**, 1369–1374. Doi: 10.1016/s0006-291x(05)80939-8.

Rubinsky, B., A. Arav, G.L. Fletcher, (1991). Hypothermic protection - a fundamental property of "antifreeze protein". *Biochem Biophys Res Commun*, **180**, 566–571. Doi: 10.1016/s0006-291x(05)81102-7.

Rubinsky, B., M. Mattioil, A. Arav, B. Barboni, G.L. Fletcher, G.L. (1992). Inhibition of Ca^{2+} and K^{+} currents by "antifreeze" proteins. *Am J Physiol*, **262**, R542-R545. Doi: 10.1152/ajpregu.1992.262.3.R542.

Scholl, C.L.; Tsuda, S.; Graham, L.A.; Davies, P.L. (2021). Crystal waters on the nine polyproline type II helicalbundle springtail antifreeze protein from *Granisotoma rainieri* match the ice lattice. *FEBS J*, **288**, 15717. Doi: 10.1111/febs.15717.

Scotter, A.J., Marshall, C.B., Graham, L.A, Gilbert, J.A., Garnham, C.P. & Davies, P.L. (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiol*, **53**, 229–239. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.06.006.

Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A. & Tsuda, S. (2007). Effect of annealing time of an ice crystal on the activity of type III antifreeze protein. *FEBS J,* **274**, 6469–6476. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06164.x.

Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A. & Tsuda, S. (2009). Fully active QAE isoform confers thermal hysteresis activity on a defective SP isoform of type III antifreeze protein. *FEBS J*, **276**, 1471–1479. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06887.x.

Tomczak, M.M., Hincha, D.K., Estrada, S.D., Wolkers, W.F., Crowe, L.M., Feeney, R.E., Tablin, F. & Crowe, J.H. (2002). A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys J*, **82**, 874–881. Doi: 10.1016/S0006-3495(02)75449-0.

Tyshenko, M.G., Doucet, D., Davies, P.L. & Walker, V.K. (1997). The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nature Biotechnol*, **15**, 887–890.

Voets, I.K. (2017). From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter*, **12**, 4808–4823, Doi: 10.1039/c6sm02867e.

Vrielink, A.S.O., Aloi, A. & Olijve, L.L.C. (2016). Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions. *Biointerphases*, **11**, 018906. Doi: 10.1116/1.4939462.

Wu, Y., Banoub, J., Goddard, S.V., Kao, M.H. & Fletcher, G.L. (2001). Antifreeze glycoproteins: relationship between

molecular weight, thermal hysteresis and the inhibition of leakage from liposomes during thermotropic phase transition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **128**, 265–273. Doi: 10.1016/s1096-4959(00)00323-7.

Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Arai, T., Sasaki, Y.C. & Tsuda, S. (2021). Subzero nonfreezing hypothermia with insect antifreeze protein dramatically improves survival rate of mammalian cells. *Int J Mol Sci*, **22**(23) 12680. Doi: 10.3390/ijms222312680.

Yamauchi, A., Arai, T., Kondo, H., Sasaki, Y.C., and Tsuda, S. (2020). An ice-binding protein from an Antarctic ascomycete is fine-tuned to bind to specific water molecules located in the ice prism planes. *Biomolecules,* **10**(5), 759. Doi: 10.3390/biom10050759.

Zachariassen, K.E. & Husby, J.A. (1982). Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature*, **298**, 865e867. Doi: 10.1038/298865a0

Zachariassen, K.E. & Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiol*, **41**, 257–279. Doi: 10.1006/cryo.2000.2289.

低温科学 81 （2023） 51–60
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 51

不凍タンパク質の構造と機能

津田　栄[1)]，新井　達也[2)]

2022 年 11 月 14 日受付，2023 年 1 月 6 日受理

我々が普段目にする氷は無数の単結晶氷の融合物，即ち多結晶氷である．単結晶氷は規則的に配列した水分子でできているが，これと同じ規則性をもつ水分子が不凍タンパク質（Antifreeze Protein, AFP）の分子表面にも存在することが最近の研究から分かって来た．即ち，AFP は小さな氷結晶を表面にまとったタンパク質と言うことができる．この様な物質が水中に存在するとき，その水を 0℃以下に冷やすとどのようなことが起こるのだろうか？　AFP は生物にどのような能力を付与しているのだろうか？　本稿では，特に魚類由来 AFP の構造と機能に関する著者らの研究を紹介する．

Structure and Function of antifreeze protein

Sakae Tsuda[1] and Tatsuya Arai[2]

A general block of ice is composed of an infinite number of single ice crystals, which is called ice polycrystalline state. Antifreeze protein (AFP) is a macromolecule that locates regularly organized hydration waters on its surface, whose arrangement is also adopted in a single ice crystal. As the consequence, AFP can specifically bind to single ice crystals, which prevents the ice polycrystalline state formation. We have been performed exploration of AFP against various cold-adapted organisms since the late 1990s, and found that many edible fishes available in the general Japanese food markets contain AFP in their body fluid. This finding enabled us to develop a mass-preparation technique of fish-derived AFPs, for which we have been performed structural and functional analyses and technological applications for many years. The advanced knowledge obtained from our results may ultimately realize a new AFP-technology that may prevent water freezing though the binding to single ice crystals, which may keep alive cells, tissues, and animals in the supercooled environment. The present review describes the overview of the water-freezing mechanism and our research findings on the fish AFPs including their structure, function, and applicability for both industry and medical fields.

キーワード：不凍タンパク質，単結晶氷，多結晶氷，熱ヒステリシス，凍結濃縮
Antifreeze protein, single ice crystal, thermal hysteresis, freeze-induced concentration, ice-like waters

連絡先
津田　栄
東京大学新領域創成科学研究科
〒277–0882　千葉県柏市柏の葉 6–2–3
東大柏 II キャンパス産総研イノベ棟 2109 室
e-mail：s-tsuda@edu.k.u-tokyo.ac.jp
1）東京大学新領域創成科学研究科
〒277–0882　千葉県柏市柏の葉 6–2–3
東大柏 II キャンパス　産総研イノベ棟 2109 室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The university of Tokyo, 2109 AIST innovation bldg., 6–2–3 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277–0882, Japan
2）東京大学新領域創成科学研究科
〒277–8561　千葉県柏市柏の葉 5–1–5
基盤棟 7 階 7H8 号室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 7H8 Kiban bldg., 5–1–5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277–8561, Japan

1．はじめに

不凍タンパク質（Antifreeze Protein，AFP）は，低温環境に晒された魚類，昆虫，微生物等の体液の凍結を防ぐと共に，これらの細胞に作用して低温下での生存率を高める生体物質である（Mahatabuddin & Tsuda, 2018；津田，2018）．即ち，AFP は脂質，塩，糖，グリセロール等の凍結保護剤と共に生物の低温適応能力を向上させるように働く．近年では 0℃以下で生物を生かし続ける「コールドスリープ（人工冬眠）」技術が広く研究されており（Takahashi et al., 2020），安全性，安定性，量産性，省エネ性等を満たす AFP が同技術に応用される可能性が指摘されている．AFP は南極海に生息するノトセニア科魚類から 1969 年に発見され，その後 2000 年にかけて北極海とその周辺に生息する魚類，植物，昆虫，菌類からの発見が相次いだ．これらの AFP は不凍作用を示す点では共通しているが，分子量や立体構造は得られる生物種に依存して大きく異なっており，それらの違いに応じて AFP Ⅰ，AFP Ⅱ，AFP Ⅲ，AFGP，βらせん型等にタイプ分けされている（Davies, 2014）．なお，AFGP は不凍糖タンパク質（Antifreeze Glycoprotein）の略称である．1990 年代後半には魚類 AFP を冷凍食品技術等に応用するための複数の特許が大手企業のユニリーバから出願され，それ以降 AFP は様々な冷熱利用技術に有用な物質と見なされるようになった．しかし，極地魚類の血液を原材料とする AFP は極めて高価であったため，研究者や技術者がその試料を大量に入手して技術応用に向けた研究を様々に展開することは困難であった．そうした状況の中，著者らは 2000 年頃に日本国内に生息する魚類，昆虫，菌類等について AFP の探索を開始し，特に北海道等の寒冷地で捕獲される複数の魚類が AFP をもつことを明らかにした（Nishimiya et al. 2008）．これと同時に日本人が日常的に食べている魚の切り身からも AFP を大量に取得できることを発見し，魚肉すり身懸濁液から AFP を精製する方法として明細書に纏め特許を取得した（津田・三浦，2008，2009）．日本には蒲鉾等の“練り物”を献立とする食文化があり，トン単位の魚肉すり身を生産する工場やその流通システムが全国に展開されている．著者らは，そうした分野を手がける国内企業の協力を得ることで，安価な魚類 AFP の量産化に向けた取り組みを続けてきた．その結果，同企業によって 2016 年 9 月に従来品の 1/10～1/100 以下の価格で AFP 試料が製品化され，現在も販売が続いている．以下では，水と氷に関する基礎的知見を踏まえた上で日本産魚類由来 AFP の構造と機能について詳述する．

2．水の凍結現象と AFP の関係

2.1　水はどのように凍るか

水を負の温度域に冷却して行くとやがて氷に変化する．日常生活の中で水が氷に変化する瞬間を目にすることは希だが，冷却加熱ステージを備えた顕微鏡システムを用いればその瞬間を何度でも繰り返し観察することができる．図 1A はそうしたステージの上に置いた水（10 μL）の顕微鏡画像である．不純物や空気が黒い影になる以外，水の中に特に物体は見当たらない．この水を例えば－0.2℃/min で冷却し続けると，凍結温度は通常－10℃以下になる．この様に，水が 0℃以下で液体状態を保つことを過冷却現象と呼ぶ．不純物を徹底的に除いた水は約－40℃まで過冷却するとされる．この過冷却水の中に極めて小さな単結晶氷（核）が出現し，その大きさが過冷却の深度で決まる臨界サイズを超えると急速に成長して凍結が起こり，水は氷（多結晶氷）に変化すると考えられている（Holten et al., 2012）．水中に存在する何らかの微粒子の表面に水分子が集積して氷核になる場合と，水分子同士が集まってクラスターを形成したものが氷核になる場合の 2 通りがあると考えられており，前者は不均一核生成（heterogenous nucleation），後者は均一核生成（homogenous nucleation）と呼ばれている（Zachariassen & Kristiansen, 2000）．なお，単結晶氷の核形成が起こり結晶成長をする際には「潜熱」が周囲に放出される．水が凍結する瞬間を撮影した顕微鏡画像を図 1B に示す．視野内の水は凍結に伴い厚みのある氷に変化するため，顕微鏡視野は暗くなり不均一模様で満たされる．この状態からステージの温度を上昇させると，0℃に近づくに連れて少しずつ氷は融解し，－1℃付近では図 1C の様な海島構造を呈する．「島」に相当する楕円～円盤型のものが単結晶氷である．つまり，凍結の瞬間にできる氷は多くの単結晶氷が境目なく融合した多結晶氷である．そこから溶け出してバラバラになった単結晶が図 1C の様に観察される．通常の氷が多結晶氷であることを端的に表わすために，実際の氷の写真を図 1D に，そのイラストを図 1E に示す．我々が普段目にする氷の中で恐らく唯一の単結晶氷が雪の結晶であり，それ以外の氷，すなわち製氷皿で作る氷，飲食に用いる氷，池に張った氷，氷山等は全て多結晶氷である．AFP を理解するためにはこの事実を知ることが欠かせない．

2.2　AFP とは

1 気圧下で生成する円盤型の単結晶氷（図 1C）は，図 1F に示される様な六角形模様に規則的に配列した水分

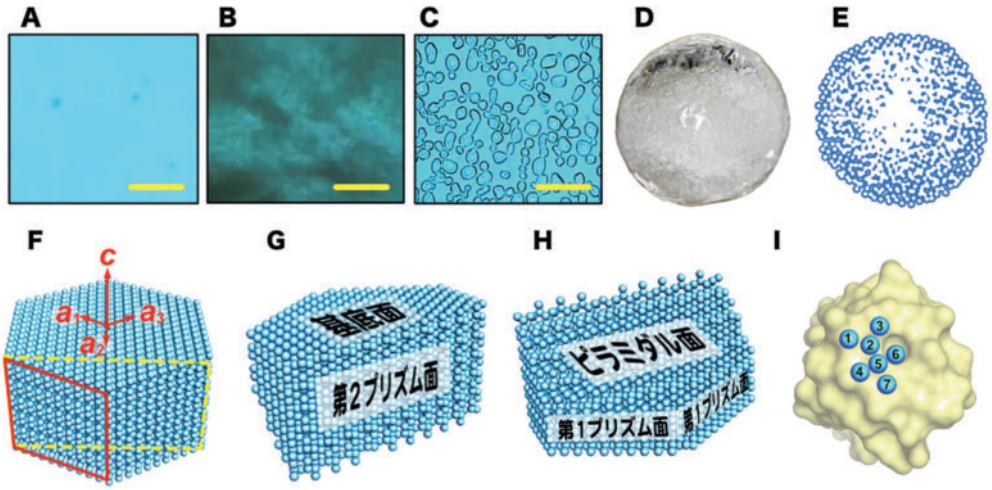


図 1：氷に関する説明．A．水の顕微鏡画像（黒は不純物）．B．水が凍結した瞬間を捉えた顕微鏡画像．C．B でできた氷（多結晶氷）を加温したときに生じる無数の単結晶氷．右下のスケールバーは 5 μm を示す．D．普段目にする氷．E．D が単結晶氷の融合物であることを表すイラスト．F．単結晶氷を構成する水の配列規則性（単位格子）．球は水の酸素原子．G．F の基底面と第 2 プリズム面（破線部分）を示したもの．H．F の第 1 プリズム面（実線部分）とピラミダル面を示したもの．I．AFP Ⅲの分子表面（GRASP 表示）に観測される 6 個の結合水．これらのうち 1，2，3，5 は第 1 プリズム面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．また，2，4，5，6，7 はピラミダル面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．

子群で構成されている．この規則性を示す最小単位のことを結晶学では単位格子または単位砲と呼ぶ．単結晶氷の単位格子は 4 つの単位ベクトル（a_1-a_3 ならびに c 軸）で規定される六方晶系に分類される．英語ではこれを hexagonal ice crystal（I_h）と呼ぶ（Hobbs, 1974）．なお，六角形模様の単位格子は単に水分子の配列規則性を示すもので，1 気圧の過冷却水の中に顕微鏡で観察される単結晶氷は必ず円盤型である．一方，空気中の水蒸気から単結晶氷が成長するときには六角板／六角柱を中心に a_1〜a_3 軸方向に結晶成長が起こり，皆が知る樹枝状氷結晶（雪の結晶）に変形する．このため，樹枝状氷結晶の中心部には必ず六角模様が観察される．図 1F（I_h）を構成する上下の六角形の氷晶面をベーサル面（基底面），実線で囲った氷晶面を第 1 プリズム面（柱面），破線で囲った氷晶面を第 2 プリズム面と呼ぶ．c 軸に対して斜めにカットした氷晶面がピラミダル面である．六角形模様は基底面にのみ観察される．これらの氷晶面の水分子の配列を図 1G と図 1H に示す（津田，2018）．0℃以下の水中に存在する単結晶氷が周囲の水分子を取り込んで結晶成長を起こしている間，これらの氷晶面は絶え間なく生成して面積を拡大し続ける．これと同時に単結晶氷同士が氷晶面を介して無限に融合し合い，多結晶氷を形成すると考えられる．

これまでに X 線や NMR などの構造生物学的手法を用いることで AFP の 3 次元分子構造が解析されてきた．その結果，AFP はタイプに依存して大きく構造骨格が異なるものの，多くの場合，それらの分子表面には一定の間隔で並んだ結合水が観察されることが分かってきた．例えば，AFP Ⅲの分子表面に水素結合している 6 個の水分子（図 1I）は，第 1 プリズム面ならびにピラミダル面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．すなわち「AFP は単結晶氷の一部を表面にまとったタンパク質」と言うことができる．AFP Ⅱは C 型レクチン，AFP Ⅲはシアル酸還元酵素，AFGP はトリプシノーゲンと構造骨格が酷似しており，これらの“先祖タンパク質”が長い年月をかけて変異を繰り返し，それらの分子表面にある結合水が氷結晶様の配置に変化したものが AFP として現在に残ったのではないか？と推察されている（Graham et al., 2022）．

上述の通り，顕微鏡下に水を凍らせて多結晶氷を作り 0℃付近にまで加温すると，図 1C の様な単結晶氷の分散状態が形成される．これと同じ操作を AFP 水溶液について行い，顕微鏡を用いて単結晶氷の海島構造を観察した例を図 2A に示す．このように AFP 水溶液中に生成する単結晶氷は，その表面に AFP が無数に結合することで米ツブの様な形になる．1 個の米ツブだけを残し，それ以外を融かす様にステージ温度を調整し，米ツブ模様の単結晶氷を高倍率で撮影した結果を図 2B と図 2C に示す．図 2B は六方両錐体（hexagonal bipyramid），図 2C は六方偏四角面体（hexagonal trapezohedron）と呼

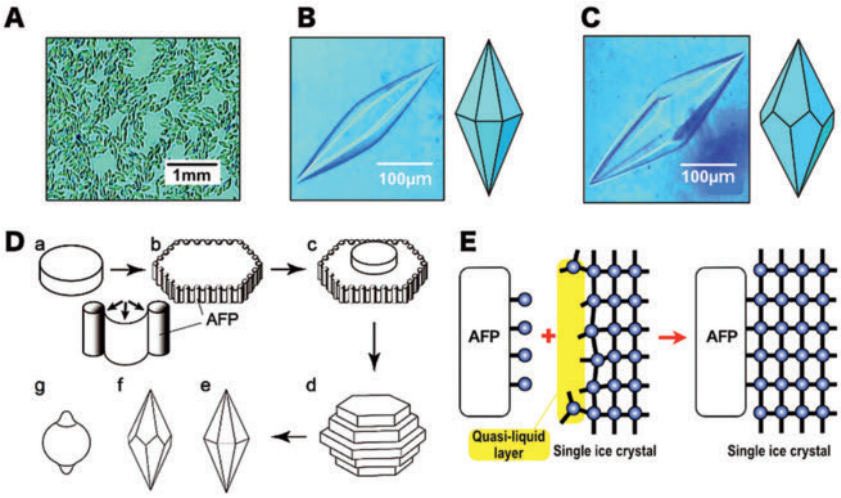


図 2：AFP の単結晶氷結合メカニズム．A．AFP 水溶液を凍結後に 0℃付近まで加温したときの顕微鏡画像．単結晶氷は米ツブ型に変形する．B．AFGP の結合によって六方両錐体（hexagonal bipyramid）に変形した単結晶氷とそのイラスト表現．C．AFP Ⅱの結合によって六方偏四角面体（hexagonal trapezohedron）に変形した単結晶氷とそのイラスト表現．D．AFP の結合に伴う単結晶氷の変形過程を表すイラスト．a．水中に生じる円盤型単結晶氷，b．AFP の結合に伴い六角平面に変形した単結晶氷，c．新たな円板型単結晶氷が二次元核生成により六角平面上に生成する様子，d．AFP 結合により六角平面型単結晶氷が積み上がって行く様子，e．B と同じ．f．C と同じ．g．昆虫 AFP などが基底面に結合したときにできるレモン型氷結晶．E．AFP の表面にある氷結晶様の結合水が単結晶氷の表面に接した瞬間に結晶中に飲み込まれる様子を表したイラスト．単結晶氷の成長界面（黄色）は Quasi liquid layer（準液体層）と呼ばれている．

ばれており，本稿ではこれらをまとめてバイピラミッド氷結晶と呼ぶことにする（津田，2018）．円盤型単結晶氷の表面にプリズム面やピラミダル面（図 1G，H）の水分子群が現われた瞬間，AFP は表面の結合水（図 1I）を介してそれらに結合し成長を止める．その結果，円盤型単結晶氷はこうしたバイピラミッド氷結晶に変形すると考えられる．円盤型単結晶氷がバイピラミッド氷結晶に変化する過程を描いたイラストを図 2D に示す．AFP に挟まれた部分が曲率を帯びるために水を取り込めず，その成長が止まる現象（図 2Db）は Gibbs-Thomson 効果として知られる．氷晶面の上に円盤型単結晶氷が生成する現象（図 2Dc）は二次元核生成（two-dimensional nucleation）と呼ばれる（Sazaki et al. 2010）．図 2E に示す様に，AFP の分子表面にある氷結晶様の結合水（図 1I）は，過冷却水中に存在する単結晶氷の表面に接触した瞬間に中に取り込まれて単結晶氷の一部になると考えられている．このため，氷結晶様の結合水は Anchored Clathrate Water（ACW）とも呼ばれる．即ち，AFP は図 2E に示す ACW メカニズムによって単結晶氷の特定の氷晶面に強く特異的に結合すると考えられる（Garnham et al., 2011）．AFP が接触する単結晶氷の成長界面は疑似液体層（Quasi-liquid layer，QLL）と呼ばれるもので，自由水と結晶水の中間の性質をもつ水分子群によって構成されると考えられている．図 1I の様な結合水に加えて，単結晶氷とは異なる五角形模様の水分子ネットワーク（polypentagonal water network）が AFP の分子表面に形成されている場合がある（Sun et al. 2014）．こうした氷結晶様の水分子ネットワークは，AFP が瞬時に QLL に混ざる上で有利に働くと考えられている．

2.3　熱ヒステリシス

魚類 AFP を結合した単結晶氷がバイピラミッド型氷結晶（図 2B，C）になることは既に述べた．この単結晶氷が顕微鏡下に観察されている状態でステージの温度を下げて行くと，例えば－2℃付近でバイピラミッドの上端と下端から爆発的な成長が起こり，針状の氷結晶になる．これは，魚類 AFP が単結晶氷の基底面に結合しておらず，その成長が強く抑制されないことに起因する．高活性型の昆虫 AFP や微生物 AFP が単結晶氷の基底面とプリズム面の両方に結合している場合には，レモン型単結晶氷（図 2Dg）の赤道付近から爆発的な成長が起こる（Scotter et al., 2006）．このように，温度低下に伴い 1 個の AFP 結合状態のバイピラミッド氷結晶が結晶成長を開始する温度のことを非束一的凝固点（non-colligative freezing point）（T_f*）と呼び，通常の水の凝

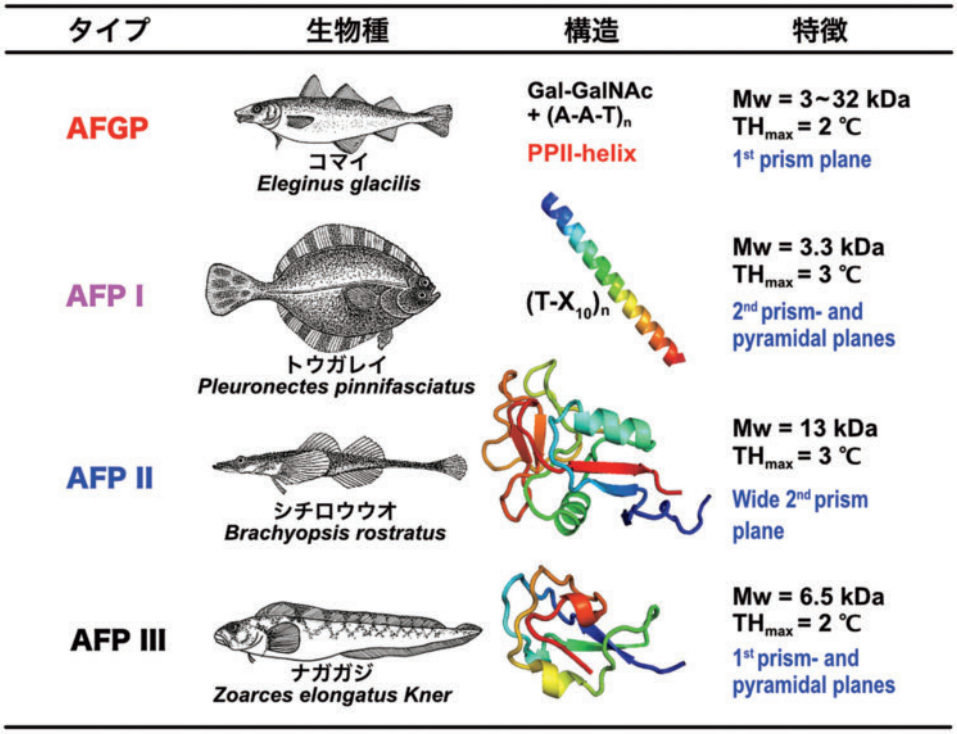


図 3：魚類由来不凍タンパク質（AFP）の分類．日本近海で捕獲されるコマイ，トウガレイ，シチロウウオ，ナガガジが不凍糖タンパク質（AFGP）並びに不凍タンパク質（AFP Ⅰ～Ⅲ）をもつことが明らかにされている．いずれも複数のアイソフォームで構成されており，AFGP のアイソフォームには分子量分布がある（3～32 kDa）．タイプに応じてアミノ酸配列，分子量，立体構造などが大きく異なる．個々の AFP が結合する氷結晶面を特徴欄に青字で示す．

固点（T_f）とは区別する．これとは逆に温度上昇に伴ってバイピラミッド氷結晶が融解する温度が融点（T_m）である．T_m と T_f* の差は熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis，TH）と呼ばれ，バイピラミッド氷結晶が成長も融解もせずに安定に存在できる温度範囲を表す（TH＝T_m－T_f*）（Raymond & DeVries, 1977）．T_mの値は AFP に依らず概ね 0℃だが，強く単結晶氷の成長を抑制する AFP は T_f*を押し下げるため TH 値が大きくなる．即ち，TH は AFP の氷結晶成長抑制能の強さを表す物理量である．なお，T_fは昇温速度，降温速度，単結晶氷サイズに依存して変化するため，AFP 間で TH 値を比較するためにはそうした測定条件を統一しなくてはならない．また，示差走査熱量計（DSC）は水が氷すなわち多結晶氷に変化するときの潜熱を測定するもので，AFP が結合した 1 個の単結晶氷の成長開始温度を測定する方法ではないため，正しい TH 値を与えない．現時点では AFP 水溶液の TH 値を測定するためには冷却加熱ステージを備えた顕微鏡システムが必要不可欠と言える．

3. 日本産魚類由来 AFP の特徴

3.1 AFGP

日本国内で捕獲される魚類の中で AFGP を含むものにコマイ（*Eleginus glacilis*, Saffron cod）（図 3）がある．AFGP は A-A-T（A：アラニン，T：スレオニン）で表わされる 3 残基のペプチドの反復配列（Tandem repeat）によって構成される一本鎖ポリペプチドであり，Thr の側鎖の OH 基は必ず二糖（*β*-D-galactosyl-(1→3)-*α*-N-acetyl-D-galactosamine）で修飾されている．AFGP は反復回数（n）が異なる複数アイソフォームとして魚体内に発現されており，n＝52（156 残基，M.w.＝34 kDa）のものを AFGP1，n＝4（12 残基，M.w.＝2.6 kDa）のものを AFGP8 と呼ぶ．これらに AFGP2（n＝45，29 kDa），AFGP3（n＝32，21.5 kDa），AFGP4（n＝26，17 kDa），AFGP5（n＝16，10.5 kDa），AFGP6（n＝12，7.9 kDa），AFGP7（n＝5，3.5 kDa）を加えた合計 8 種類のアイソフォームが AFGP の天然物を構成すると考えられている（Osuga & Feeney, 1978）．なお，コマイ由来の AFGP は A が R（アルギニン）や P（プロリン）に置換されたアイソフォームを含んでいる（Burcham et al., 1086）．AFGP は南極海に生息するノトセニア科魚類と北極海

に生息するタラ科魚類から発見されたものだが，これらの魚類が赤道を越えて北極と南極の間を往来したとは考え難いため，各々が如何にして AFGP 遺伝子を獲得したかが大きな謎であった．DNA 解析の結果，南極魚類由来の AFGP はトリプシノーゲンから派生したと考えられる一方，北極魚類由来 AFGP の遺伝子にはそうした遺伝子の痕跡が全く認められなかった．これにより，AFGP は 1 つの先祖タンパク質から派生したものではなく，収斂進化（convergent evolution）の産物であると考えられる様になった（Chen et al, 1997）．AFGP は冷水に極めて良く溶けること（1,200 mg mL^{-1} 以上），約 200 mg mL^{-1} の AFGP 水溶液について約 2℃の TH 値が見積もられること，単結晶氷の第 1 プリズム面に特異的に結合すること等も明らかにされている（Tsuda et al., 2020）．また，AFGP は細胞の脂質二重膜に結合することによって＋4℃下で生殖細胞や浮遊細胞の生存時間を延ばす細胞保護機能を有する（Rubinsky et al. 1990）．また，AFGP にはポリプロリンタイプⅡヘリックス構造の形成が予測されているが，現時点ではその X 線結晶構造が解かれていない．

3.2 AFP Ⅰ

AFP Ⅰは多数の連続した A から成る約 40 残基の一本鎖ポリペプチドである（図 3）．AFP Ⅰの N 末端は必ず D-T-A-S-D- で始まり，この後に（T-X_{10}）n（X は主として A）で表わされる 11 残基のペプチドの反復配列が続く（n＝3）．日本国内に生息するトウガレイ（*Pleuronectes pinnifasciatus,* Barfin plaice）（図 1）が合計 9 種類の AFP Ⅰアイソフォームを発現しており，著者らはその中の 1 つである 40 残基の AFP Ⅰ（D-T-A-S-D-A-A-A-A-A-A-A-T-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-T-A-K-A-A-A-E-A-A-A-A-T-A-A-A-A-）（BpAFP1）の構造解析を行った．この配列から分かるように BpAFP1 の 30/40 残基（75%）が疎水性アミノ酸（A）である．それにも関わらず，BpAFP1 は冷水に対して極めて高い水溶性を示す（＞400 mg mL^{-1}）．また，濃度約 200 mg mL^{-1} における TH 値は約 3℃と非常に高い．BpAFP1 は低濃度（0.01 mg mL^{-1}）では第 2 プリズム面とピラミダル面にだけ結合し，濃度を 10 倍（0.1 mg mL^{-1}）に高めると全ての氷結晶面に結合を拡大する風変わりな性質を有する（Mahatabuddin et al., 2017）．低温下（＋4℃）における優れた細胞保護機能は AFP Ⅰにも認められる（Kamijima et al. 2013）．AFP の中で最初に X 線構造が解かれたのは米国の Winter flounder（*Pseudopleuronectes americanus*）が発現する 37 残基の AFP Ⅰ（wfAFP）であり，同分子は一本鎖 α ヘリックスであった（Sicherl & Yang, 1995）．BpAFP1 も同じ構造を形成し，その棒状分子の片側に T（スレオニン）の OH 基が 16.5Å の間隔で配列すると考えられる．Alaskan plaice や Yellow-tail flounder から見出された AFP Ⅰも n＝3 のペプチドだが，例外的に n＝12 の AFP Ⅰ（Maxi, 194 残基）が 2004 年に発見された．X 線結晶構造解析の結果，Maxi は 400 個以上の五角形模様の水分子ネットワークに取り囲まれていることが判明した．このような単結晶氷に酷似した水分子ネットワークを伴うことで Maxi は単結晶氷の全面に結合する能力を有すると考えられている．但し，Maxi は極めて不安定なタンパク質である．なお AFPI の仲間はカジカ科魚類からも発見されており，（Thr-X_{10}）の繰り返しが不規性である点と N 末端領域に必ず 1 個の Pro が含まれている点がカレイ類由来の AFP Ⅰと異なっている．

3.3 AFP Ⅱ

AFP ⅡはＣ型レクチンと高い相同性をもつ約 130 アミノ酸残基（分子量 14kDa）の球状タンパク質である（図 3）．AFP Ⅱはワカサギ（*Hypomesus nipponensis,* Japanese smelt）等のキュウリウオ科の魚類に加えてタイセイヨウニシン（*Clupea harengus*, Atlantic herring），ケムシカジカ（*Hemitripterus americanus*, Sea raven），シチロウウオ（*Brachyopsis rostratus,* Longsnout poacher）等から発見され，3 次元分子構造が解析されている．ニシンやワカサギ由来の AFP Ⅱが単結晶氷への結合に 1 分子あたり 1 個の Ca^{2+} イオンを必要とするのに対し（Ca^{2+} 依存型 AFP Ⅱ），ケムシカジカやシチロウウオ由来の AFP Ⅱはこれを必要としない（Ca^{2+} 非依存型 AFP Ⅱ）（Nishimiya et al., 2008；津田, 2018；Arai et al., 2019）．シチロウウオ由来の AFP Ⅱ（LpAFP）は僅か 2 種類のアイソフォームで構成される．他の AFP と同様に，LpAFP も冷水に対して 200 mg mL^{-1} 以上の良好な水溶性を示し，同濃度の LpAFP 水溶液について約 3℃の TH 値が見積もられている．LpAFP は 0.01 mg mL^{-1} 以下では単結晶氷の第 2 プリズム面に特異的に結合するが，濃度上昇に伴って結合領域を拡大し，0.1 mg mL^{-1} では単結晶氷の全面に結合する．この性質は LpAFP と BpAFP についてのみ認められている（Tsuda et al. 2020）．全ての AFP Ⅱが 10 個の C（システイン）を含んでおり，これらが分子内で 5 対のジスルフィド結合を形成することで全体構造が安定化すると考えられている．＋4℃下での優れた細胞保護機能は AFP Ⅱにも認められている．

3.4　AFP Ⅲ

AFP Ⅲはゲンゲ科魚類の *Macrozoarces americanus*, Ocean pout から発見されたもので，wfAFP と並んで多くの機能解析が行われている AFP である（図 3）．日本国内では寒冷地の汽水域に生息するナガガジ（*Macrozoarces elongatus Kner*, Notched-fin eelpout）から AFP Ⅲが発見された（Nishimiya et al., 2005）．AFP Ⅲはアミノ酸組成に偏りの無い 65–70 残基のポリペプチド（Mw＝7 kDa）であり，ナガガジ由来 AFP（NfeAFP）の天然物は 13 種類ものアイソフォームの混合物である．これらの AFP Ⅲアイソフォームは陽イオン交換樹脂に結合する 6 種類（SP タイプ）と陰イオン交換樹脂に結合するもの 7 種類（QAE タイプ）に分けられる．著者らは前者に属する NfeAFP6 と後者に属する NfeAFP8, 11, 13 の遺伝子組換え体を作製し，それらの TH 値が大きく異なることを明らかにした．また，NfeAFP6 の 20 番目の A（アラニン）を G（グリシン），T（スレオニン），V（バリン），I（イソロイシン），L（ロイシン）に置換したものの間で TH 値が大きく異なることを見出した（Mahatabuddin et al., 2018）．これらの X 線構造を解析した結果，最も高活性の A20I 変異体（図 1I）の分子表面にのみ強固な五角形模様の水分子ネットワークが形成されていることが明らかになった．AFP Ⅲは 3–5 残基の短鎖 β 構造で構成される円形セグメントが 2 つ寄り添った全体構造を形成している．これをプレッツェル（Pretzel）構造と呼ぶことがある（Antson, et al. 2001）．ヒトシアル酸合成酵素と構造が似ていることから同酵素が AFP Ⅲの先祖タンパク質と考えられている．一方の円の表面に単結晶氷と結合するアミノ酸残基が配置しており，それらに捕捉された結合水が単結晶氷のプリズム面とピラミダル面に特異的に結合すると考えられている．NfeAFP も冷水に溶けるが他の AFP に比べると溶け切るまでに要する時間が長い．最大溶解度は約 100 mg mL^{-1}，TH の最大値は約 2℃と報告されている．AFP Ⅲも +4℃下において優れた細胞保護機能を発揮する．

4. AFP の応用技術

4.1　凍結濃縮インヒビター

何らかの物質を添加した水を冷凍庫等で凍らせたとき，その物質が氷の中央付近に濃縮される凍結濃縮（Freeze-induced concentration）と呼ばれる現象が観察されることがある（Yamanouchi et al., 2013）．図 4 にその例を示す．これは四角形のアクリルケースに赤インク水を入れて冷凍庫で凍らせる実験を行ったときの画像で，凍結に伴いインク成分が濃縮されて色玉が形成することを示している（図 4A→B）．この実験では最も冷熱に近い場所が容器のフチと水面であるため，それらの付近にある水が最初に凍結する．即ち，それらの場所で単結晶氷が発生し，互いに強く結びついて多結晶氷を形成する（図 4C）．単結晶氷を構成する水分子は様々な配置をとるが（図 1F～H），水分子の配列が違う氷晶面であっても成長界面にある準液体層（図 2E）を介して無限に結びつくことができ多結晶氷が形成されると考えられる．一方，構造が異なる赤インク成分は単結晶氷への結合が許されない．その結果，赤インクは多結晶氷から排除されて未凍結部分に溜まると推察される．この現象は添加する物質の構造や量，水の粘性，冷却速度等に依っては視認されない．

AFP は単結晶氷に強く特異的に結合するため，凍結濃縮現象を抑制する．AFP Ⅲを用いたその実験例を図 4 に示す（図 4A→D）．AFP を添加した赤インク水においても容器のフチと水面付近にある水の中に無数の単結晶氷が生成するが，AFP が個々の単結晶氷に結合して成長と融合を阻害する結果，多結晶氷ではなく単結晶氷の分散状態が形成される．赤インク成分は互いに結びつかない単結晶氷の隙間に存在し，凍結濃縮が起こらない．こうした凍結濃縮インヒビターとしての AFP の活用例を図 4F～H に示す．これらは左から 0，0.05，0.2 mg mL^{-1} になるように AFP Ⅲを添加した 0.5 重量％濃度の寒天ゲルの凍結解凍後の写真である（凍結温度＝－18℃，凍結時間＝12 時間）．図 4F のように，AFP を添加していない寒天ゲルでは多結晶氷が高分子鎖のネットワーク構造を破壊する．その結果，ゲル構造が保持されず保水力も失われる．一方，0.2 mg mL^{-1} という極微量の AFP を添加した寒天ゲルはその内部が単結晶氷の分散状態で満たされ，多結晶氷ができないためにゲル構造が保持される（図 4G, H）．凍結濃縮は加工食品，スープ類，氷菓子類，麺類，パン類，野菜，果実，種子，清涼飲料水，酒類，医療品，化粧品，インク顔料，高分子ゲル，細胞，組織，臓器などの含水物を凍結保存する際に問題になる現象である（津田，2018）．従って，AFP はこうした含水物の凍結保護剤として活用できる可能性がある．なお，糖やジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide，DMSO）等も単結晶氷と容易に結びつき凍結濃縮を抑制するため，食品や細胞の凍結保護剤として広く用いられている．また，液体窒素やディープフリーザー（－80℃）を用いて瞬間凍結を行った場合にも凍結濃縮が抑制されるが，これらに比べると AFP はエネル

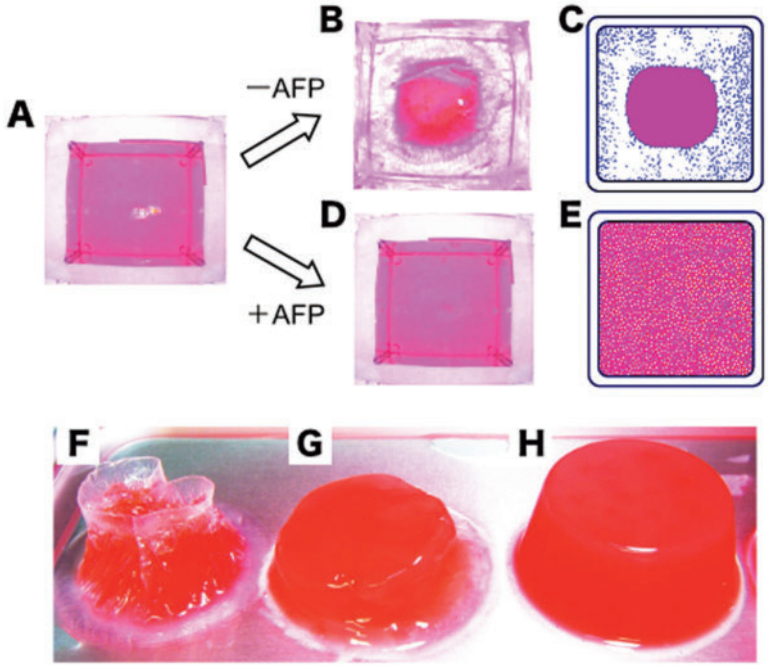


図 4：AFP の凍結濃縮抑制効果．A．透明なアクリルケースに入れた赤インク水（50 mL）．B．A を家庭用冷凍庫（−18℃）で凍らせたときに観察される凍結濃縮現象．C．B のイラスト表現．結晶成長する氷（多結晶氷）からインクが排除されて濃縮する．D．AFP を添加した赤インク水凍結物の画像．凍結濃縮現象が抑制される．E．D のイラスト表現．AFP が結合した単結晶氷が分散状態を形成するためインク成分が濃縮されない．F〜H．左から 0，0.05 mg mL^{-1}，0.2 mg mL^{-1}になるように AFP Ⅲを添加した 0.5 重量％の寒天ゲルを凍結解凍した後の写真．

ギー消費量が少なく取り扱いが容易な凍結濃縮インヒビターと言える．

4.2　コールドスリープ（人工冬眠）技術への応用可能性

AFP 水溶液の凍結過程の想像図を図 5 に示す．水（a）を冷やし続けると 0℃以下でも凍らない過冷却水（b）になることは既に述べた．この過冷却水の中に極めて小さな単結晶氷（核）が生成することで凍結が起こり水は多結晶氷（c）に変化するが，このとき AFP は個々の単結晶氷に結合して，それらの結晶成長と続く多結晶氷形成を阻害している可能性がある．即ち，AFP は水の過冷却状態を安定化すると想像されるが，現時点でその実験的証拠は得られていない．著者らはそうした予想に関係するデータを得るために，体液成分として高活性型 AFP をもつオオクワガタ（*Dorcus hopei binodulosus*, Stag beetle）の幼虫を −5℃の冷凍庫内に静置して 24 時間後の生存率を調べた（Arai, et al., 2021）（山内の稿参照）．驚いたことに，冷凍庫から取り出した 10/10 頭の幼虫の身体は凍っておらず，室温に戻ると元気に動き回った（生存率＝100％）．一方，幼虫を湿紙の上に置いた状態で同じ実験を行うと幼虫の身体は凍結し，3/3 頭

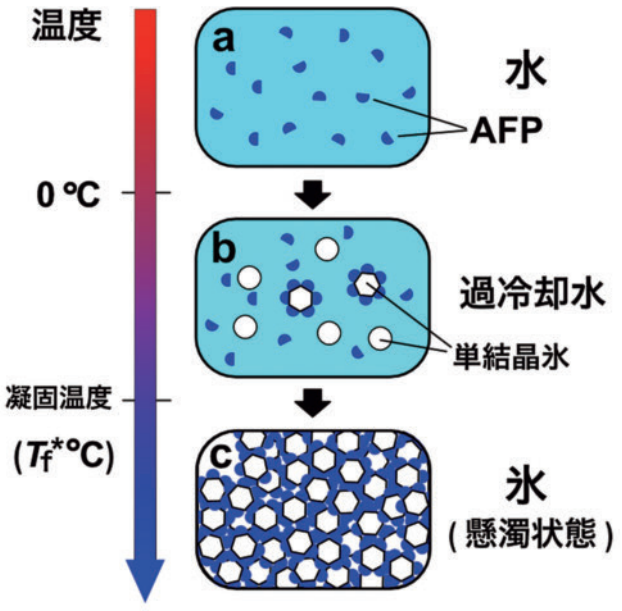


図 5：不凍タンパク質（AFP）の水溶液が凍結する過程の想像図．（a）AFP を含んだ水．（b）過冷却水の中に発生した単結晶氷に AFP が結合する様子を描いたイラスト．円盤型の単結晶氷は AFP の結合に伴い六角平面やバイピラミッド型に変形する．（c）AFP を含む水の凍結状態を描いたイラスト．AFP が結合した微細氷結晶の集合体（懸濁状態）が生成すると考えられる．このときの凝固温度（T_f*℃）は非束一的凝固点（Non-colligative freezing point）と呼ばれており，通常の凝固点とは異なる．

がすべて死滅した（生存率＝0%）．また，高活性型 AFP を添加した細胞保存液を用いてラット膵島細胞を −5℃の過冷却状態で保存したところ，20 日後で 53%という極めて高い生存率が得られた（Yamauchi et al., 2021）．過冷却状態にある昆虫の体液や細胞保存液の中で AFP が単結晶氷と結びつき，それらを極微少サイズに抑制したために，細胞が損傷を受けず生命機能が保持されたのかもしれない．水の凍結現象が生命に危機的状況をもたらすことは疑いようがない．より多くの研究データを得ることで生物の低温適応能力と AFP の関係が一層明らかになり，AFP がコールドスリープ技術等に応用される日が来ることを期待したい．

謝辞

本研究を進めるにあたり，株式会社ニチレイ 小泉雄史氏，井上敏文氏，石井寛崇氏から極めて多くのご協力を頂きました．不凍タンパク質の精製技術は産業技術総合研究所 三浦 愛氏とともに開発しました．北海道大学大学院生命科学院 山内彩加林氏（現 北海道大学低温科学研究所 助教）には特に細胞保存に関する極めて多くのデータを取得して頂きました．北海道大学低温科学研究所 教授 佐﨑 元氏には本論文を査読して頂きました．これらの方々を始め，AFP の研究にご協力を頂いた全ての方々に心から感謝を申し上げます．

参考文献

Antson, A. A., Smith, D. J., Roper, D. I., Lewis, S., Caves, L. S. D., Verma, C. S., Buckley, S. L., Lillford, P. J., & Hubbard, R. E. (2001) Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. J. Mol. Biol., **305**, 875–889.

Arai, T., Nishimiya, Y., Ohyama, Y., Kondo, H., & Tsuda, S. (2019) Calcium-binding generates the semi-clathrate waters on a type II antifreeze protein to adsorb onto an ice crystal surface. Biomolecules, **9**, 162.

Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Nishimiya, Y., Sasaki Y. C., & Tsuda, S. (2021) Discovery of hyperactive antifreeze protein from phylogenetically distant beetles questions its evolutionary origin. Int. J. Mol. Sci. **22**, 3637.

Burcham, T. S., Osuga, D. T., Rao, B. N. N., Bush, C. A., & Feeney, R. E. (1986) Purification and primary sequences of the major arginine-containing antifreeze glycopeptides from the fish *Eleginus gracilis*. J. Biol. Chem. **261**, 6384–6389.

Chen, L., DeVries, A. L., & Cheng, C.-H. C. (1997) Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 3817–3822.

Davies, P. L. (2014) Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. Trends Biochem. Sci., **39**, 548–555.

Garnham, C. P., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2011) Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 7363–7367.

Graham, L. A., Gauthier, S. Y., & Davies, P. L. (2022) Origin of an antifreeze protein gene in response to Cenozoic climate change. Sci. Rep., **12**, 8536.

Hobbs, P. V. (1974) *Ice Physics*, Oxford Univ Press, London, UK, pp. 461–523.

Holten, V., Bertrand, C. E., Anisimov, M. A., & Sengers, J. V. (2012) Thermodynamics of supercoold water. J. Chem. Phys. **136**, 094507 (1–18).

Kamijima, T., Sakashita, M., Miura, A., Nishimiya, Y., & Tsuda, S. (2013) Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. PLoS One, **8**, e73643.

Takahashi, T. M., Sunagawa, G. A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., & Sakurai, T. (2000) A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. Nature **406**, 611–614.

Mahatabuddin, S., Hanada, Y., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., Davies, P. L., & Tsuda, S. (2017) Concentration-dependent oligomerization of an alpha-helical antifreeze polypeptide makes it hyperactive, Sci Rep, **7**, 42501.

Mahatabuddin, S. & Tsuda, S. (2018) Applications of Antifreeze Proteins: Practical Use of the Quality Products from Japanese Fishes, Adv Exp Med Biol, **1081**, 321–327.

Mahatabuddin, S., Fukami, D., Arai, T., Nishimiya, Y., Shimizu, R., Shibazaki, C., Kondo, H., Adachi, M., & Tsuda, S. (2018) Polypentagonal ice-like water networks emerge solely in an activity-improved variant of ice-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **115**, 5456–5461.

Nishimiya, Y., Sato, R., Takamichi, M., Miura, A., & Tsuda, S. (2005) Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout, *Zoarces elongatus Kner*. FEBS J, **272**, 482–492.

Nishimiya, Y., Kondo, H., Takamichi, M., Sugimoto, H., Suzuki, M., Miura, A., & Tsuda, S (2008) Crystal structure and mutational analysis of Ca^{2+}-independent type II antifreeze protein from Longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus*. J. Mol. Biol., **382**, 734–746.

Nishimiya, Y., Mie, Y., Hirano, Y., Kondo, H., Miura, A., & Tsuda, S. (2008) Mass preparation and technological development of an antifreeze protein - Toward a practical use of biomolecules - Synthesiology, **1**, 7–14.

Osuga, D. T. & Feeney, R. E. (1978) Antifreeze glycoproteins from Arctic fish. J. Biol. Chem. 253, 5338–5343.

Raymond, J. A. & DeVries, A. L. (1977) Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2589–2593.
Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M., & DeVries, A. L. (1990) The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures, Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 1369–1374.
Sazaki, G., Zepeda, S., Nakatsubo, S., Yokomine, M., & Furukawa, Y. (2010) Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 19702–19707.
Scotter, A. J., Marshall, C. B., Graham, L. A., Gilbert, J. A., Garnham, C. P., & Davies, P. L. (2006) The basis for hyperactivity of antifreeze proteins, Cryobiology, **53**, 229–239.
Sicherl, F. & Yang, D. S. C. (1995) Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. Nature **375**, 427–431.
Sun, T., Lin, F.-H., Campbell, R. L., Allingham, J. S., & Davies, P. L. (2014) An antifreeze protein folds with an interior network of more than 400 semi-clathrate waters. Science, **343**, 795–798.
津田　栄，三浦　愛（2008）特許「魚類由来の不凍タンパク質」第 4228068 号.
津田　栄，三浦　愛（2009）特許「魚類由来の不凍タンパク質」第 4332646 号.
津田　栄（2018）不凍タンパク質の機能と応用．Functions and Applications of Antifreeze Protein，シーエムシー出版（289 頁），東京.
Tsuda, S., Yamauchi, A., Khan, N. M., Arai, T., Mahatabuddin, S., Miura, A., & Kondo, H. (2020) Fish-derived antifreeze proteins and antifreeze glycoprotein exhibit a different ice-binding property with increasing concentration. Biomolecules, **10**, 423.
Yamanouchi, T., Xiao, N., Hanada, Y., Kamijima, T., Sakashita, M., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., & Tsuda, S. (2013) Dependence of freeze-induced concentration inhibition on antifreeze protein. Low Temp. Sci. **71**, 91–96.
Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Arai, T., Sasaki, Y. C., & Tsuda, S. (2021) Subzero nonfreezing hypothermia with insect antifreeze protein dramatically improves survival rate of mammalian cells. Int. J. Mol. Sci. **22**, 12680.
Zachariassen K. E., & Kristiansen, E. (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. Cryobiology **41**, 257–279.

低温科学 81 （2023） 61–70
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 61

メダカに学ぶ脊椎動物の冬季適応戦略

中山　友哉[1)]，吉村　崇[2)]

2022 年 11 月 29 日受付，2023 年 1 月 6 日受理

四季が存在する温帯地域では，季節の変化に伴って大きな環境変動が起きる．温帯に生息する動物はやがて訪れる冬季の環境を乗り越えるために，様々な生理機能や行動を秋から冬にかけて変化させるが，その分子機構の多くは謎に包まれている．本稿では，季節適応の研究において優れたモデルであるメダカに対して，オミクス解析やケミカルゲノミクス，ゲノム編集などの様々なアプローチを適用することで明らかとなってきた脊椎動物の冬季適応戦略について紹介する．また，メダカで明らかとなったメカニズムについてヒトとの共通点やヒトへの応用についても議論する．

Winter adaptation strategies of vertebrates: lessons from medaka

Tomoya Nakayama[1] and Takashi Yoshimura[2]

In temperate climate, various ecosystem components show dynamic seasonal changes, for example, animals change their physiology and behavior from autumn to winter to cope with the oncoming winter. However, their underlying molecular mechanisms remain poorly elucidated. In this paper, we introduce winter adaptation strategies of vertebrates that have been revealed by integrating various approaches such as multi-omics analysis, chemical genomics, and genome editing to medaka fish (*Oryzias latipes*), an ideal model for studying seasonal adaptation. We also discuss similarities between medaka and humans as well as possible applications of our findings to human health.

キーワード：メダカ，冬季適応，色覚，社会性，冬季うつ病
medaka, winter adaptation, color perception, sociability, winter depression

1．はじめに

四季が存在する温帯地域では，季節の変化に伴って 1 年を周期とした環境変動が起きる．1 年中気温が安定している熱帯と異なり，温帯では冬に気温が大きく下がる上，エネルギー源となる食料が乏しくなるため，多くの動物にとって厳しい季節である．そのため，温帯に生息する動物は冬への適応戦略機構を進化の過程で獲得してきた．冬眠はよく知られた冬への適応戦略の一つであるが，冬眠をしない動物においても体内の様々な生理機能や行動が秋から冬にかけて変化することが知られている．繁殖はエネルギーコストが高い活動の一つであり，温帯に生息する多くの動物は特定の季節にのみ繁殖を行う．ウズラやハムスターなど孵卵期間や妊娠期間が短い

連絡先
吉村　崇
名古屋大学
〒464–8601　愛知県名古屋市千種区不老町
Tel. 052–789–4056
e-mail：takashiy@agr.nagoya-u.ac.jp
1）名古屋大学高等研究院（Institute for Advanced Research, Nagoya University），名古屋大学大学院生命農学研究科動物統合生理学研究室（Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University）
2）名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所（Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University），名古屋大学大学院生命農学研究科動物統合生理学研究室（Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University）

動物は，日長が長くなる春に繁殖を開始し，日長が短くなる秋に繁殖を停止する．彼らは食料が豊富な時期に仔が生まれるよう春から夏にかけて繁殖活動を行い，秋から冬にかけてエネルギー消費を抑えるため繁殖を停止する生存戦略をとる．また，回遊や渡りも特定の季節に行われる．ブリやマイワシは水温の低下を避けて秋から冬に暖かい海域に移動する．また，ハクチョウやカモなど多くの渡り鳥は食料が豊富で温暖な気候を求めて，秋に大規模な渡りをすることが知られている．このように，動物はやがて訪れる厳しい冬季の環境を乗り越えるために，様々な生理機能や行動を変化させるが，その分子機構の多くは謎に包まれている．

地球上には姿，形，能力が異なる多種多様な生き物が存在しているが，ある生命現象の仕組みを解き明かすには，数ある生物種の中からその研究に最適な種を選ぶことが重要である．モデル動物の代表とも言えるマウス（*Mus musculus*）やショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）は生物学の発展に大きく寄与してきたが，季節に対する応答性が不明瞭である．当研究室ではこれまで洗練された季節応答を示すウズラ（*Coturnix japonica*）を用いることで，春を感知して繁殖を開始する脳内情報伝達経路を明らかにしてきたが（Yoshimura et al., 2003; Nakao et al., 2008; Nakane et al., 2010），ウズラは遺伝子操作が難しく，遺伝子改変動物の作出がルーチンワークとして行えないという限界があった．一方，メダカ（*Oryzias latipes*）は，北は青森，南は沖縄まで日本の広い範囲に生息しており，明瞭な季節応答性を示すことが知られている．また，ゲノム編集技術が確立しており，遺伝子操作が比較的容易に行える大きな利点があるため，脊椎動物の季節適応の研究において優れたモデルである．本稿では，この優れたモデルであるメダカに対してオミクス解析やケミカルゲノミクス，ゲノム編集など様々なアプローチを適用することで，明らかとなってきた脊椎動物の冬季の短日・低温環境への適応機構について紹介する．

2. 季節（低温）で変化する光感受性と色覚

繁殖はあらゆる生物において重要なイベントであり，動物たちは繁殖相手を惹きつけるために様々な工夫をする．クジャクやイワドリは，鮮やかな飾り羽や扇型のトサカを雌に見せることでアピールし，雌はこれらの装飾を指標に繁殖相手を決める．またサケやアマサギのように繁殖期に特有の体色となる婚姻色を示す動物や，カメレオンのように体色を変えながら求愛する動物もいる．このように動物の装飾や体色は，繁殖期における視覚の重要性を示している．眼の網膜には，視覚をつかさどっている視細胞があり，桿体細胞が薄暗いところで薄明視に関わっており，錐体細胞が明るいところで色覚を担っている．ヒトの眼には，青，緑，赤の 3 つの色を感じる錐体視物質（オプシン）がそれぞれ一つずつある一方で，メダカの眼には紫，青，緑，赤の 4 つの色を感じるオプシンがそれぞれ二つずつ，合計 8 つも存在する．これまでの魚類を用いた研究から，これらのオプシン遺伝子の発現量は，生息地域の環境変化に応じて変化することが報告されている．例えば，トゲウオの赤オプシン（LWS（Long-wave-sensitive）オプシン，赤感受性）の発現量は日長に応じて変化し（Sato et al., 2014），スズメダイの赤オプシンおよび緑オプシン（RH2（Rhodopsin 2）オプシン，緑感受性）の発現量は水深に応じて変化することがわかっている（Stieb et al., 2016）．これらの報告から，遺伝子発現の変化により色に対する感受性が変化する可能性は指摘されていたものの，制御機構や生理学的意義については，これまで未解明のままであった．

私たちはメダカをモデルとして脊椎動物の季節適応の研究をしている中で，自然条件下において夏と冬でメダカの行動が大きく変化することに気づいた．この行動の季節変化に興味を持ち，短日・低温（10 時間点灯，14 時間消灯，水温 8℃）の冬を模した条件下で飼育したメダカと，長日・温暖（14 時間点灯，10 時間消灯，水温 26℃）の夏を模した条件下で飼育したメダカの行動を観察した．その結果，屋外での観察の結果と同様，夏のメダカは水槽全体を活発に動き回ったのに対して，冬のメダカは水槽の底でじっとしていることが明らかとなった（図 1a）．この行動の季節変化に興味を持ち，光に対する応答性を季節間で比較することとした．多くの魚は新規環境下で一方の側面から強い光を当てると，それから逃げるように逆側の側面を泳ぐ習性（負の走光性）が知られている（Brockerhoff et al., 1995）．そこで，この行動を指標に光に対する応答性を夏のメダカと冬のメダカで評価した．その結果，夏のメダカは，光を避ける負の走光性を示したのに対して，冬のメダカは反応しなかったため，冬のメダカは光に対する感受性が低下していることが示唆された（図 1b）．

多くの動物が繁殖期になると婚姻色を示し，異性にアピールするように，メダカも繁殖期である春から夏にかけて鰭に黒い点が現れ，体の橙色・赤色が濃くなる婚姻色を示す．季節によって光に対する応答性が異なることから，婚姻色に対する嗜好性も季節によって異なることが考えられた．そこで，この仮説を検証するために，コ

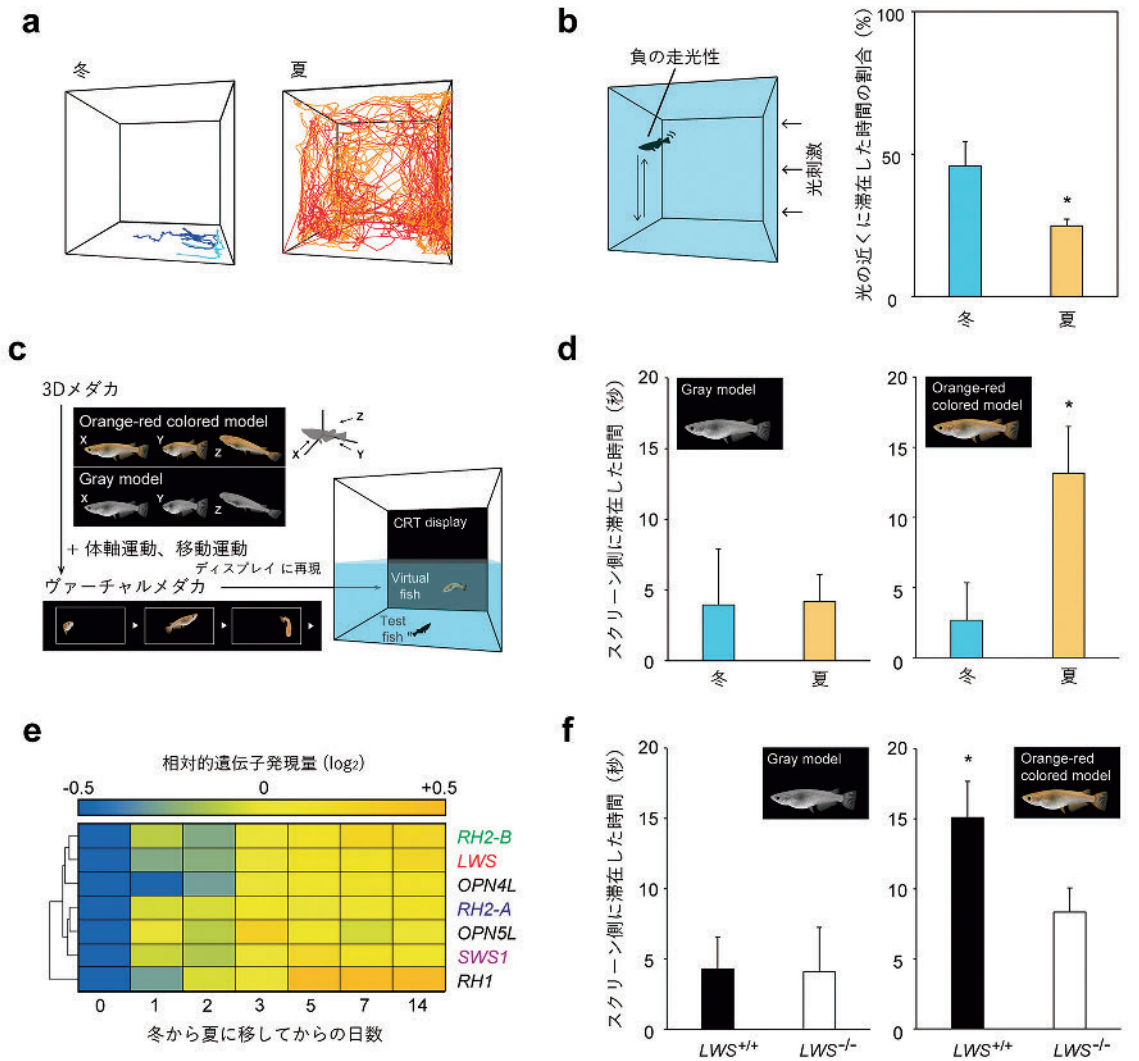


図 1：(a) 冬と夏のメダカの遊泳軌跡．社会性の強いメダカの自然な状態での行動を観察するため，2 匹を供試しており，異なる色の軌跡はその 2 匹の軌跡を示している．(b) 夏のメダカと冬のメダカの光に対する反応の違い．夏のメダカは光刺激に対して負の走光性を示すが，冬のメダカは示さない（*P<0.05）．(c) ヴァーチャルメダカを用いた体色に対する嗜好性の評価．パソコン上で作製した 3D のメダカに動き（Biological motion）を追加することで，モニター上で動くヴァーチャルメダカを作製した．モニターの前に水槽を置いて，実際のメダカを入れ，配偶者嗜好性試験を行った．(d) ヴァーチャルメダカの体色を変えて嗜好性試験を行ったところ，夏のメダカは婚姻色のメダカに誘引されたのに対して，冬のメダカは誘引されなかった（*P<0.05）．(e) 冬の条件から夏の条件に移した際のオプシンに関連する遺伝子発現の変動．マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果，冬の条件から夏の条件に移すとメダカのオプシンの発現が劇的に上昇することが明らかになった．青色と黄色はそれぞれ遺伝子の発現が低い状態と高い状態を示す．(f) 赤オプシン欠損メダカは，夏の条件下で，野生型に比べて婚姻色の配偶者に対する嗜好性が低下していた（*P<0.05）

ンピュータグラフィックスで作製したヴァーチャルメダカを作製し，行動実験を実施した．メダカの求愛行動はオスがメスに対して行うため，メスのヴァーチャルメダカをディスプレイに映し出し，ヴァーチャルメダカの体色を変えることで，婚姻色に対するオスのメダカの嗜好性を検討した（図 1c）．ヴァーチャルメダカを用いることで，メダカが分泌する化学信号（フェロモン等）が嗜好性に関与している可能性を排除することができ，またヴァーチャルメダカの動きを完全に同じものにすることができるため，個体ごとに異なる行動パターンが嗜好性に影響している可能性を排除することができる．これによりメダカの体色に対する嗜好性のみを評価することができる．まず，白黒のヴァーチャルメダカを提示したところ，冬のメダカも夏のメダカも，ヴァーチャルメダカに誘引される度合い（ディスプレイの近くに滞在した時間）は共に少ないことがわかった．続いて，婚姻色のヴァーチャルメダカを提示したところ，冬のメダカは誘引されなかった一方で，夏のメダカは婚姻色のヴァーチャルメダカに強く誘引された（図 1d）．以上のことから，メダカは冬と夏では光感受性や色覚が異なることが

明らかとなった．

次に光感受性や色覚の季節変化の分子メカニズムを明らかにするために，冬の環境から夏の条件に移行した際のメダカの眼の時系列試料を用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した．その結果，視覚をつかさどるオプシンやオプシンの下流の光情報伝達経路の遺伝子の発現が，冬では著しく低下していたのに対して，夏の条件に移すと急激に上昇することが明らかになった（図 1e）．この中には，ロドプシンである *RH1*，赤色光感受性オプシンである *LWS*，緑色光感受性オプシンである *RH2-B*，青色光感受性オプシンである *RH2-A*,紫外線感受性オプシンである *SWS1* が含まれていた．前述の通り，メダカは繁殖期になると体の橙色や赤色が濃くなる婚姻色を示す．そこで，これらのオプシンの発現が夏に上昇する生理学的意義を検討するため，橙色や赤色の感受に重要な *LWS* に着目して，さらなる検証を進めた．

まず，*in situ* hybridization 法を用いて，赤色光感受性オプシン遺伝子（*LWS*）の眼における遺伝子発現を時空間的に解析したところ，光を感知している網膜の視細胞層において遺伝子発現が確認され，またその発現量は冬のメダカよりも夏のメダカで高かった．さらに，CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により，*LWS* を欠損し，赤色光を感知することができないメダカを作出して，光に対する応答性や婚姻色の配偶者に対する嗜好性を評価した．その結果，*LWS* 欠損メダカでは，負の走光性と，婚姻色ヴァーチャルメダカに対する嗜好性が，野生型の *LWS* を欠損していないメダカに比べて低下していることが明らかになった（図 1f）．最後に，オプシン遺伝子の発現を制御する因子を検討したところ，水温の上昇が引き金となってオプシン遺伝子の発現が誘導されることがわかった．以上の結果から，メダカは水温の季節変化に応じて，光感受性や色覚がダイナミックに変化していることが明らかになった（Shimmura et al., 2017）．

冬は，夏に比べ日照時間が短く，また水温も低いことから，仔魚や稚魚の成育には適さない．そのため，メダカは秋になると繁殖行動を停止させ，冬には食料をほとんど摂取せず，川底に留まって活動量を低下させる．この間，食料を探したり，婚姻色により交配相手を見分けたりする必要性がなくなるため，オプシン遺伝子の発現を抑えることは理にかなっている．また遺伝子発現を抑えることでタンパク質生産のエネルギーコストを抑制することは，重要な適応的意義があると考えられる．一方，春から夏にかけて日照時間が長くなり，水温が上昇すると，オスのクジャクが尾羽を伸ばしてメスを惹きつけるのと同様に，メダカは婚姻色を発達させることで異性を惹きつける．この婚姻色を見分けるために，繁殖期に眼の光感受性や色覚を顕著に発達させ，それにより繁殖の成功率をあげているのは興味深い適応進化である．

3. 季節で変化する社会性

ヒトの季節性感情障害（seasonal affective disorder：SAD）は特定の季節にのみ，抑うつ症状などの気分の変調が現れる精神疾患で，冬に現れることが多いため「冬季うつ病（winter depression）」とも呼ばれる．冬季うつ病の主な症状には倦怠感や不安感の増加，活力や社会性・性欲の低下，体内時計の乱れ（概日リズム障害），過眠や過食などがあげられる（Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018）．これらは季節繁殖や冬眠などの動物の季節応答の表現型と類似点が多いため，冬季うつ病は季節繁殖や冬眠の名残だと古くから指摘されてきた．また，冬にうつ様の行動が引き起こされることは様々な動物においても観察されており，このような行動変化は冬の厳しい環境を乗り切る適応戦略と考えられている．しかし，冬季うつ病の発症機序や冬のうつ様行動の分子メカニズムは明らかとなっていなかった．

メダカは「メダカの学校」と言われるように群れを作って行動する社会性の高い動物である．前述したように，メダカにおいても行動が季節によって大きく変化するため，社会性や不安様行動が季節によって変化することが考えられた．そこで，メダカにおいてうつ様行動が季節によって変化するかを検討するため，夏の長日・温暖条件（14 時間点灯，10 時間消灯，水温 26℃）と冬の短日・低温条件（10 時間点灯，14 時間消灯，水温 8℃）で飼育したメダカを用意し，社会性や不安の度合いを評価できる行動実験を実施した．見慣れない新奇な水槽に入れられた魚はしばらく水槽の底で身を潜めるが，この時間が長いと不安が強いと解釈される（新奇水槽試験）．冬の条件で飼育されたメダカは夏の条件で飼育されたメダカに比べて，水槽の底での滞在時間が長くなることがわかった．また，明るいエリアと暗いエリアを設けた水槽に入れたときは，不安が強いと外敵に見つかりにくい暗いエリアに滞在することが知られている（明暗水槽試験）．そこで明暗水槽試験を実施したところ，冬条件のメダカは夏条件よりも暗いエリアの滞在時間が長く，新奇水槽試験と同様に不安が強いと評価された．三部屋式社会性試験は動物の社会性を評価する行動試験である．透明な仕切りで三部屋に区切られた水槽の中央の部屋に観察対象の個体を入れ，残りの部屋の一方にだけ他個体

を入れる．すると中央の部屋の観察個体は他個体の入った部屋の近くのエリア（preferential area）に滞在する「社会性行動」が観察される．しかし，冬条件のメダカはpreferential areaでの滞在時間が夏条件に比べて短かった（図2a）．これらの行動実験から，メダカは冬の環境下では社会性が低下していることが明らかになった．

冬における不安感の増加や社会性の低下はヒトの冬季うつ病の特徴である（Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018）．うつ病はストレスを含めた厳しい環境を乗り切る適応機構であることを考えると，メダカで観察された冬季の社会性の低下や不安様行動などの表現型からメダカが冬季うつ病のモデルとなり得ると考えた．また，うつ病は複雑な多因子疾患であり，後述するように様々な仮説が提案されているが理解が進んでいない．そのため既存の知見に基づく仮説駆動型のアプローチ（hypothesis-driven approach）には限界があり，発見駆動型のアプローチ（discovery-driven approach）が有効であると考えられた．そこで仕組みの全容を理解するためにマルチオミクスの網羅的な解析を行うことにした．まずメタボローム解析で脳の代謝物の季節変化を検討した．冬条件と夏条件にそれぞれ暴露したメダカの脳を用いてキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析（CE-TOFMS）によるメタボローム解析を実施し，水溶性イオン代謝物の季節変化を調べた．その結果，ヒトのうつ病と関連が指摘されているセロトニンやグルタミン酸などの神経伝達物質や抗酸化物質のグルタチオンなど，68個の代謝物がメダカの脳で変化していることが明らかになった．選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）が抗うつ作用を示すことから，セロトニンはうつ病に寄与していると考えられてきた（セロトニン仮説）（Andrews et al., 2015）．メダカの脳においてはセロトニンの量が季節によって変化しており，冬に増加していることが明らかとなった．また，NMDA型グルタミン酸受容体に作用するケタミンは即効性のある抗うつ薬として注目されている．メダカの脳においてはグルタミン酸の量は冬に増加していた．さらに近年，酸化ストレスとうつ病の関係が指摘されているが（Yang et al., 2018），抗酸化物質であるグルタチオンは冬に減少していることが明らかとなった．このように，ヒトのうつ病に関与する複数の代謝物が冬と夏のメダカの脳で変動することが明らかになったことから，改めてメダカは冬季うつ病のモデルとして妥当であると考えられた．

次に脳における遺伝子発現の季節変化を網羅的に調べるためにトランスクリプトーム解析を実施した．その結果，3,000個以上の転写産物量が夏と冬の間で変化することが明らかになった．冬季うつ病の症状の一つに約24時間のリズムを刻む概日リズムの障害が知られており，これが冬季うつ病の一因と考えられてきた（概日リズム仮説）（Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018）．睡眠・覚醒，体温，ホルモン分泌など，細胞レベルから個体レベルまで，様々な生理機能に概日リズムが認められるが，この概日リズムは「時計遺伝子」と総称される一連の遺伝子の転写翻訳フィードバックループによって制御されている（Takahashi, 2017）（金らの原稿参照）．ヒトの冬季うつ病患者の遺伝解析で，時計遺伝子の*PER*，*CRY*，*BMAL1*，*CLOCK*などに多型が見つかっており，時計遺伝子と冬季うつ病の関連が指摘されていた（Garbazza & Benedetti, 2018）．メダカのトランスクリプトーム解析の結果，冬条件のメダカでは，時計遺伝子の発現リズムが不明瞭になっており，冬季うつ病患者同様，概日リズムが冬季に乱れていることが示唆された．次に発現変動していた遺伝子群についてカノニカルパスウェイ解析を実施して，夏と冬で活性が変化する情報伝達経路を探索したところ，うつ病との関連が広く知られているグルココルチコイド受容体シグナル伝達経路やエストロゲン受容体シグナル伝達経路を見出した．ストレスを受けると視床下部―下垂体―副腎（hypothalamus-pituitary-adrenal：HPA）軸が活性化し，グルココルチコイドの分泌が亢進するが，HPA軸の異常はうつ病を含めた様々な精神疾患との関連が報告されている（Pariante & Lightman, 2008）．また閉経後の女性だけでなく，男性においてもエストロゲンが抗うつ作用を持つことが知られている（Xu et al., 2017）．さらにこれらの情報伝達経路のほかにも，炎症反応を担うインターロイキンに関連する遺伝子群や，炎症の原因となる酸化ストレスに関連するNRF2抗酸化経路の活性が冬と夏の間で変わることが明らかになった．この結果はメタボローム解析で検出した抗酸化物質のグルタチオン量の季節変化の結果とも一致する．近年，炎症反応はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患だけでなく，うつ病を含めた精神疾患の病態や発症に関与することが指摘されている（うつ病炎症仮説）（Mille & Raison, 2016; Wohleb et al., 2016）．炎症性サイトカイン刺激は活性酸素種の増加を介して神経細胞の障害を誘導すると考えられている．この神経細胞障害によって神経細胞の樹状突起スパインの密度が減少する（Mille & Raison, 2016）．樹状突起スパインはシナプス後部の棘状構造であり，シナプス後電位や活動電位の発生に関与する．うつ病患者においては海馬の樹状突起スパインの密度の低下が報告されているが，冬型のメダカにおいても海馬相

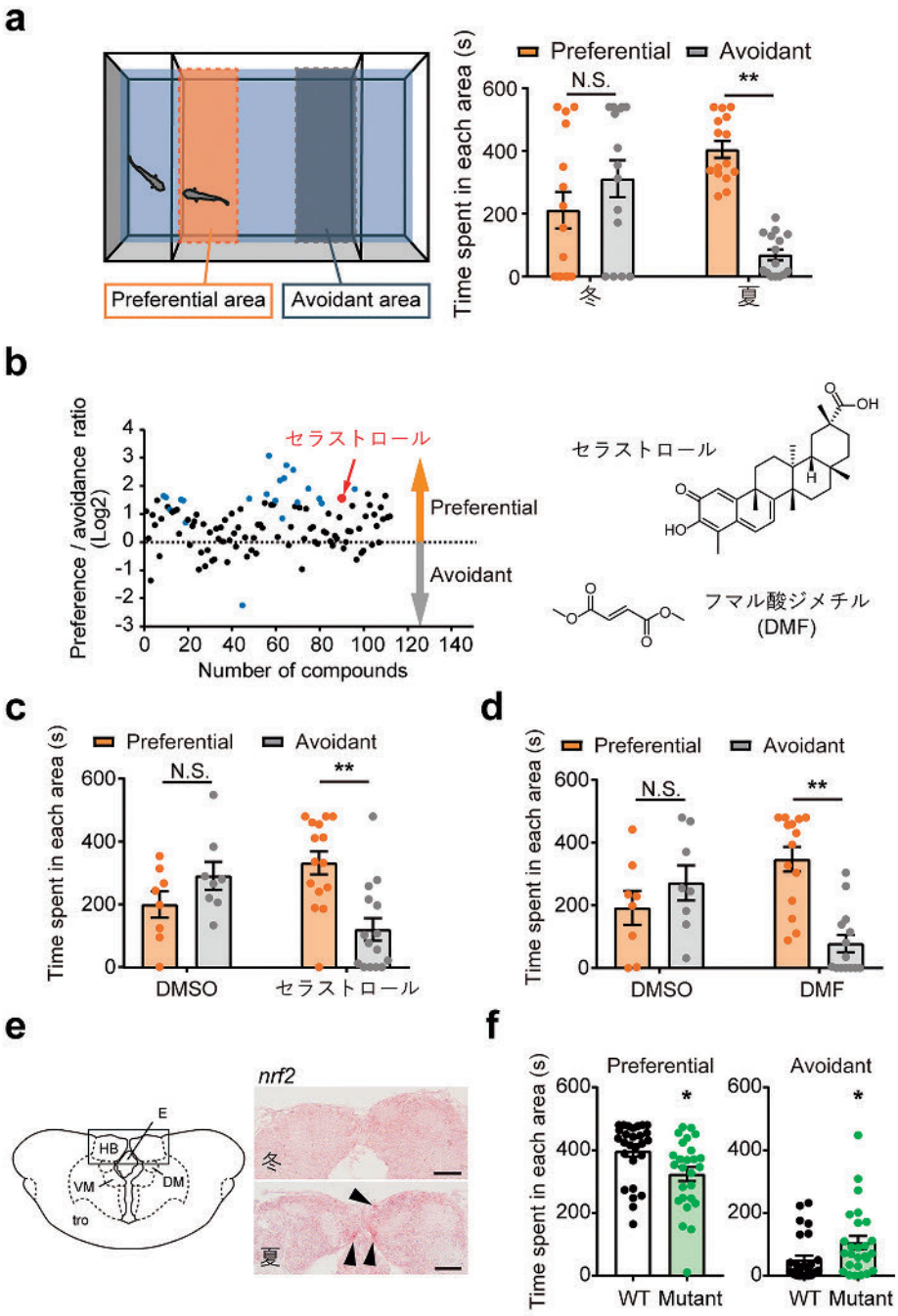


図 2：(a) 三部屋式社会性試験の模式図．夏の条件で飼育したメダカはより多くの時間を他個体の近くの Preferential area で過ごしたが，冬の条件で飼育したメダカは他の魚に興味を示さなかった（two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test．$^{**}P<0.01$，N.S. 有意差なし，平均±SEM，n＝15）．(b) 112 種類の既存薬スクリーニングの結果．セラストロールは，1 回目，2 回目，3 回目のスクリーニングを通過した唯一の薬物であった．Y 軸は Preference area と Avoidance area での滞在時間の log2 比を示す．(c) セラストロールを投与したメダカの三部屋式社会性試験の結果．セラストロール投与によって，Preferential area に滞在する時間が有意に長くなった（two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test．$^{**}P<0.01$，N.S. 有意差なし，平均±SEM，n＝8–15）．(d) DMF を投与したメダカの三部屋式社会性試験の結果．DMF の投与によって，Preferential area に滞在する時間が有意に長くなった（two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test．$^{**}P<0.01$，N.S. 有意差なし，平均±SEM，n＝8–14）．(e) 手綱核における *nrf2* の発現部位．黒矢尻は *nrf2* のシグナルを示す（スケールバーは 50 μM）．HB：手綱核；E：松果体；DM：終脳背側野内側部，VM：視床腹内側核；tro：視索．(f) *nrf2* 変異体における三部屋式社会性試験の結果．*nrf2* 変異体は Preferential area に滞在する時間が有意に短くなった（$^{*}P<0.05$，平均±SEM，n＝26–27）．

同領域の樹状突起スパイン密度が低くなることが確認された．

メタボローム解析とトランスクリプトーム解析を通じて，夏条件と冬条件のメダカの脳の間に様々な違いが明らかとなり，ヒトのうつ病との共通点が多数あぶりだされたが，その中のどれが決定的な役割を果たしているかはわからなかった．そこで化合物スクリーニングによって重要な因子を絞り込むことにした．ただし，表現型スクリーニングでヒット化合物が見つかったとしても，化合物のターゲット同定は容易ではない．一般的には細胞ベースアッセイであってもターゲット同定は容易ではないので，動物個体を用いた表現型スクリーニングにターゲット未知の化合物を用いることは無謀と思われた．そのため，この研究ではターゲットが既知で，安全性も確認されている既存薬ライブラリーを用いた既存薬再開発（drug repositioning）のアプローチを採用することにした．冬の環境で飼育したメダカの水槽に既存薬を投薬し，24 時間後に三部屋式社会性試験を使って，冬季の社会性の低下を改善する既存薬を探索した．生化学実験とは異なり，動物の行動実験は結果がばらつきやすく，再現性を確認することが極めて重要なので，二人の実験者が独立して実験を実施し，どちらが実施しても再現性を確認できる化合物を探索した（図 2b）．その結果，大変幸運なことに，百数十個の既存薬の中から再現性良く社会性を改善するセラストロールを見出すことに成功した（図 2b，c）．セラストロールは中国伝統医薬「雷公藤」の成分の五環トリテルペノイドで，抗がん作用や抗肥満作用，抗炎症作用などが知られていたが，中枢神経系への効果は知られていなかった．文献を調べてみると，セラストロールには様々な標的タンパク質があることがわかったが，そのうちの一つにカノニカルパスウェイ解析で見出していた NRF2（NF-E2-related factor 2）があった（Seo et al., 2011）．活性酸素種の刺激を受けた細胞では NRF2 が活性化し，タンパク質修復や抗酸化物質産生に関わる遺伝子群の転写を促進することで酸化ストレスを減らし，炎症を抑える．NRF2 に制御される抗酸化物質の一つにグルタチオンがあるが，本研究のメタボローム解析で見出したグルタチオンが夏に高いという結果とも一致していた．炎症はうつ病発症の一因と指摘されているが，*Nrf2* 欠損マウスがうつ様行動を示すことが報告されていることも注目に値する（Martín-de-Saavedra et al., 2013）．

前述したように多くの化合物は類似した様々なタンパク質に作用するため，仮説の検証実験が不可欠である．セラストロールも例外ではなく多数のターゲットを持つことが知られているため，まずセラストロールとは化学構造の異なる NRF2 アクチベーターのフマル酸ジメチル（DMF）においても冬季の社会性を改善できることを確認した（図 2d）．また，*in situ* hybridization 法により，*nrf2* の発現部位を調べたところ，*nrf2* はうつ病の発症に重要な役割を果たす手綱核（habenula）で発現していることをわかった（図 2e）．さらに CRISPR/Cas9 法で *nrf2* 遺伝子の変異メダカを作出し，三部屋式社会性行動テストを実施した結果，*nrf2* 遺伝子変異メダカは野生型に比べて preferential area における滞在時間が短くなることがわかった．以上の結果から，冬条件のメダカにおける NRF2 抗酸化経路の活性の低下が冬季うつ様行動を惹起すること，さらにセラストロールが NRF2 抗酸化経路を活性化することで冬季うつ様行動を改善していることが示唆された（図 2f）（Nakayama et al., 2020）．

ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類は脊椎動物であり，マウスと比べて安価で小さく，動物個体を用いた表現型スクリーニング（phenotypic screening）においてもスループットが良い大きなメリットがある．また，神経伝達物質やその受容体，さらにはそれらを標的とした薬剤の効果においてヒトとの高い相同性が認められる．そのため，近年欧米のメガファーマにおいてもゼブラフィッシュが精神疾患のモデル動物として利用されているが，メダカはあまり用いられてこなかった．今回，明瞭な季節応答を示すメダカをモデルとしてケミカルゲノミクスのアプローチを適用することで，メダカの冬季うつ様行動の制御に NRF2 抗酸化経路が関わっていることを明らかにすることができた．外部環境が厳しい時はあまり動き回らず，じっとして厳しい時期をやり過ごした方が良いので，メダカの冬季のうつ様行動は厳しい環境を乗り切る適応戦略と言える．同様に，ヒトの冬季うつ病や大うつ病（major depression）も厳冬期の屋外の自然環境や，激しいストレスを回避する適応機構と考えることができる．SAD の症状は秋から冬にかけて現れ，春から夏にかけて消失するのが一般的である．冬から春への季節的な環境変化は SAD の究極の治療法であり，これはメダカにおいても同様である．現在広く用いられているうつ病の動物モデルは，SAD の症状である自発的でかつ反復性の気分障害は示さない．SAD 患者と冬に近い環境で飼育されたメダカの表現型の類似性を考えると，メダカをモデルとした研究による発見は季節的に調節される感情障害の理解と治療に役立つことが期待される．

4. ヒトとの共通点とヒトへの応用

自身の生活環を自然環境に身を任せている動物と異なり，私たち人間は照明や空調を用いることで，光や温度など本来季節によって変化する環境因子を人工的に制御し，1年中快適な環境で生活することができる．また，季節に関わらず，いつでも野菜や果物，魚を食べることができるようになったため，現代の生活から季節感が薄らいでいるが，実は我々ヒトの気分や免疫機能・代謝などの生理機能も季節の影響を受けて変化する．また，感染症や心疾患・肺がんなどの病気の発症率にも季節の偏りがあり，多くが冬季に重症化することも知られている（Stevenson et al., 2015）．今回紹介した冬季うつ病もその一つである．冬季うつ病をもたらす主要な環境要因は，秋から冬における日長や日照時間の減少だと考えられている（Rosenthal et al., 1984）．実際，日長の変化が小さい低緯度地域においては冬季うつ病の発症率は1%以下であるが，欧米などの高緯度地域における罹患率は人口の約10%だと推算されている．日本においても，冬の日照時間が短い東北地方や日本海側の地域では冬季うつ病の発症率が高い．また，冬季うつ病の治療には冬の日照時間の減少を人工的に補う「高照度光療法」が有効とされている（Rosenthal et al., 1984）．しかし，高照度光療法はまぶしい光源の前に長時間拘束される上に，頭痛や焦燥感を覚えるなどの副作用があるほか，中断すると抑うつ症状が再発する可能性が高いことが危惧されている．一方，汎用される抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）の冬季うつ病への有効性も疑問視されている，そのため，冬季うつ病の発症機序の解明と，高照度光療法に代わる新たな治療薬の開発が期待されている．

1つ目に紹介した研究では，メダカの光感受性や色覚が季節によって変化していることを明らかにした．また，これらの季節変化が眼におけるオプシン遺伝子のダイナミックな発現変動によってもたらされていることも明らかにすることができた．興味深いことに色覚の季節変化はヒトにおいても報告されている（Jordan & Mollon, 1993; Welbourne et al., 2015）．また，SAD患者は健常者と比べて冬に網膜の光感受性が低下しており，夏または高照度光療法によって網膜の光感受性が回復する．これらの事実は，ヒトにおいても網膜の光感受性や色覚が季節によって変化することを示唆しているが，その分子メカニズムは明らかではなかった．そこで，メダカで明らかとなったメカニズムが哺乳類においても共通しているかを検討したところ，マウスにおいてもメダカと同様，網膜の光感受性が季節によって変化することが明らかとなった（Okimura et al., 2021）．一方，メダカと異なり，マウスではオプシン遺伝子の発現は季節変動しておらず，日長によって制御されているドーパミンシグナル伝達経路を介して網膜の光感受性が季節変動していることが明らかとなった．メダカのオプシン遺伝子の発現は水温によって制御されていた．一方，マウスのドーパミンシグナル伝達経路は温度ではなく，日長によって制御されていた．マウスの網膜の光感受性が日長による影響を受けることは，前述したヒトのSAD患者の事例とも共通しており，今後網膜のドーパミンシグナル伝達経路を標的とする薬剤を開発することによって，SADの治療または予防のための別の治療標的を提供する可能性が期待される．

2つ目に紹介した研究では，メダカをモデルとすることで，冬のうつ様行動に抗酸化経路であるNRF2抗酸化経路が重要であることを明らかにした．また，ケミカルゲノミクスのアプローチからメダカの冬季うつ様行動を改善させる薬であるセラストロールを発見することができた．セラストロールは現在，炎症性疾患や癌の治療に使用されており，NFκBや熱ショックタンパク質90など複数の分子標的を持っている（Kannaiyan et al., 2011）．さらに，セラストロールはNRF2抗酸化経路を活性化することで抗炎症作用を発揮する（Seo et al., 2011; Divya et al., 2016）．メダカにおいては，構造的に異なるNRF2活性化物質であるDMFも冬のうつ様行動を改善させ，CRISPR/Cas9によって作製した*nrf2*変異体は社会性が低下していた．同様に，*Nrf2*欠損マウスがうつ病様行動を示すことや，うつ病モデルマウスにおいてNRF2アゴニストによる治療が抗うつ効果を示すことが報告されている（Martín-de-Saavedra et al., 2013）．さらに，*nrf2*は夏の条件において手綱核で発現していた．手綱核は魚類から哺乳類まで保存されている神経核であり，抗うつ薬のケタミンの作用部位という報告もあることから，うつ病への関与が指摘されている．これらの事実から，NRF2は冬季うつ病の新たな治療標的になる可能性があることを示唆しており，この研究をもとにメダカがヒトの冬季うつ病の理解と創薬に貢献することが期待される．

参考文献

Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson, J. A. (2015). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in

depression and the antidepressant response. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 51, 164–188. https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2015.01.018

Brockerhoff, S. E., Hurley, J. B., Janssen-Bienhold, U., Neuhauss, S. C. F., Driever, W., & Dowling, J. E. (1995). A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92 (23), 10545–10549. https://doi.org/10.1073/PNAS.92.23.10545

Divya, T., Dineshbabu, V., Soumyakrishnan, S., Sureshkumar, A., & Sudhandiran, G. (2016). Celastrol enhances Nrf2 mediated antioxidant enzymes and exhibits anti-fibrotic effect through regulation of collagen production against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Chemico-Biological Interactions, 246, 52–62. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2016.01.006

Garbazza, C., & Benedetti, F. (2018). Genetic factors affecting seasonality, mood, and the circadian clock. Frontiers in Endocrinology, 9 (AUG), 481. https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00481/BIBTEX

Jordan, G., & Mollon, J. D. (1993). The Nagel anomaloscope and seasonal variation of colour vision. Nature 1993 363: 6429, 363(6429), 546–549. https://doi.org/10.1038/363546a0

Kannaiyan, R., Shanmugam, M. K., & Sethi, G. (2011). Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. Cancer Letters, 303(1), 9–20. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2010.10.025

Lavoie, M.-P., Lam, R. W., Bouchard, G., Sasseville, A., Charron, M.-C., Gagné, A.-M., Tremblay, P., Filteau, M.-J., & Hébert, M. (2009). Evidence of a biological effect of light therapy on the retina of patients with seasonal affective disorder. Biological Psychiatry, 66(3), 253–258. https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.11.020

Martín-de-Saavedra, M. D., Budni, J., Cunha, M. P., Gómez-Rangel, V., Lorrio, S., del Barrio, L., Lastres-Becker, I., Parada, E., Tordera, R. M., Rodrigues, A. L. S., Cuadrado, A., & López, M. G. (2013). Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. Psychoneuroendocrinology, 38(10), 2010–2022. https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2013.03.020

Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. Nature Reviews Immunology, 16(1), 22–34. https://doi.org/10.1038/nri.2015.5

Nakane, Y., Ikegami, K., Ono, H., Yamamoto, N., Yoshida, S., Hirunagi, K., Ebihara, S., Kubo, Y., & Yoshimura, T. (2010). A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (34), 15264–15268. https://doi.org/10.1073/pnas.1006393107

Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R., & Yoshimura, T. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. Nature, 452 (7185), 317–322. https://doi.org/10.1038/nature06738

Nakayama, T., Okimura, K., Shen, J., Guh, Y.-J., Tamai, T. K., Shimada, A., Minou, S., Okushi, Y., Shimmura, T., Furukawa, Y., Kadofusa, N., Sato, A., Nishimura, T., Tanaka, M., Nakayama, K., Shiina, N., Yamamoto, N., Loudon, A. S., Nishiwaki-Ohkawa, T., Shinomiya, A., Nabeshima, T., Nakane, Y., & Yoshimura, T. (2020). Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 202000278. https://doi.org/10.1073/pnas.2000278117

Okimura, K., Nakane, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., & Yoshimura, T. (2021). Photoperiodic regulation of dopamine signaling regulates seasonal changes in retinal photosensitivity in mice. Scientific Reports 2021 11: 1, 11(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81540-w

Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Trends in Neurosciences, 31(9), 464–468. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2008.06.006

Rosenthal, N. E., Sack, D. A., Gillin, J. C., Lewy, A. J., Goodwin, F. K., Davenport, Y., Mueller, P. S., Newsome, D. A., & Wehr, T. A. (1984). Seasonal affective disorder. Archives of General Psychiatry, 41(1), 72–80. https://doi.org/10.1001/archpsyc.1984.01790120076010

Seo, W. Y., Goh, A. R., Ju, S. M., Song, H. Y., Kwon, D.-J., Jun, J.-G., Kim, B. C., Choi, S. Y., & Park, J. (2011). Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 407 (3), 535–540. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.03.053

Shao, Y. T., Wang, F. Y., Fu, W. C., Yan, H. Y., Anraku, K., Chen, I. S., & Borg, B. (2014). Androgens increase *lws* opsin expression and red sensitivity in male three-spined sticklebacks. PLOS ONE, 9(6), e100330. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100330

Shimmura, T., Nakayama, T., Shinomiya, A., Fukamachi, S., Yasugi, M., Watanabe, E., Shimo, T., Senga, T., Nishimura, T., Tanaka, M., Kamei, Y., Naruse, K., & Yoshimura, T. (2017). Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception. Nature Communications, 8 (1), 412. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00432-8

Stevenson, T. J., Visser, M. E., Arnold, W., Barrett, P., Biello, S., Dawson, A., Denlinger, D. L., Dominoni, D., Ebling, F. J., Elton, S., Evans, N., Ferguson, H. M., Foster, R. G., Hau, M., Haydon, D. T., Hazlerigg, D. G., Heideman, P., Hopcraft, J. G. C., Jonsson, N. N., Kronfeld-Schor, N., Kumar, V., Lincoln, G.

A., MacLeod, R., Martin S. A. M., Martinez-Bakker, M., Nelson, R. J., Reed, T., Robinson, J. E., Rock, D., Schwartz, W. J., Steffan-Dewenter, I., Tauber, E., Thackeray, S. J., Umstatter, C., Yoshimura, T., & Helm, B. (2015). Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 282(1817). https://doi.org/10.1098/RSPB.2015.1453

Stieb, S. M., Carleton, K. L., Cortesi, F., Marshall, N. J., & Salzburger, W. (2016). Depth-dependent plasticity in opsin gene expression varies between damselfish (Pomacentridae) species. Molecular Ecology, 25(15), 3645–3661. https://doi.org/10.1111/MEC.13712

Takahashi, J. S. (2016). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nature Reviews Genetics 2016 18: 3, 18(3), 164–179. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150

Welbourne, L. E., Morland, A. B., & Wade, A. R. (2015). Human colour perception changes between seasons. Current Biology, 25(15), R646-R647. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.06.030

Wirz-Justice, A. (2018). Seasonality in affective disorders. General and Comparative Endocrinology, 258, 244–249. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2017.07.010

Wohleb, E. S., Franklin, T., Iwata, M., & Duman, R. S. (2016). Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. Nature Reviews Neuroscience, 17(8), 497–511. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.69

Xu, Y., Ma, L., Jiang, W., Li, Y., Wang, G., & Li, R. (2017). Study of sex differences in duloxetine efficacy for depression in transgenic mouse models. Frontiers in Cellular Neuroscience, 11, 344. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00344

Yang, Y., Cui, Y., Sang, K., Dong, Y., Ni, Z., Ma, S., & Hu, H. (2018). Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. Nature, 554(7692), 317–322. https://doi.org/10.1038/nature25509

Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., & Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. Nature, 426(6963), 178–181. https://doi.org/10.1038/nature02117

低温科学 81 （2023） 71–80
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 71

脊椎動物における温度受容機構の進化的変化と環境適応のつながり

齋藤　茂[1)]

2022 年 12 月 5 日受付，2023 年 1 月 6 日受理

動物は環境温度を鋭敏に感じとり適した温度を選択する，または危険な温度を忌避するなどの行動応答を介し外界の温度変化に能動的に適応する能力を発達させてきた．末梢の感覚神経から入力される温度情報は適切な行動応答に欠かせないことから，様々な種が多様な環境に適応する進化過程で温度受容機構は変化してきたと考えられる．近年，温度受容体を起点とした分子的なアプローチによる種間比較解析が進み，その機能が種間で異なることが明らかとなってきた．本総説では特に，環境適応に関連した温度応答行動，また温度受容体の進化的変化，およびその構造基盤を解明した最新の研究を紹介する．

The association between the evolutionary changes of the thermosensory system and environmental adaptation in vertebrates

Shigeru Saito[1]

Animals evolved the ability to sense and behaviorally respond to changing ambient temperatures. Sensory inputs from peripheral neurons are essential for exerting proper behavioral responses, thus the evolutionary changes of the thermosensory system likely played a fundamental role in the adaptation processes to diverse environments. In recent years, comparative analyses of temperature receptors were performed in various animal species, which revealed the divergence of their functional properties among species. The purpose of this review is to summarize the recent advances in the researches focusing on the evolutionary changes in both behavioral responses and temperature receptors related to the environmental adaptation, as well as the structural basis for the functional changes of temperature receptors.

キーワード：温度受容体，環境適応，温度応答行動，温度感受性 TRP チャネル，構造基盤
Temperature receptors, environmental adaptation, behavioral responses, thermosensitive TRP channels, structural basis

1．はじめに

温度は生体恒常性に欠かせない代謝機能や運動機能など様々な生理機能に影響を与え，時に生死をも左右し得る環境要因である．しかし，生物は極地のような寒冷地から砂漠のような灼熱の地域まで多様な温度条件の環境

連絡先
齋藤　茂
生理学研究所（生命創成探究センター）
〒444–8787　愛知県岡崎市明大寺町字東山 5–1
Tel. 0564–59–5287
e-mail：sshigeru@nips.ac.jp
1）自然科学研究機構　生理学研究所　細胞生理研究部門
（〒444–8787　愛知県岡崎市明大寺町字東山 5–1）
自然科学研究機構　生命創成探究センター　温度生物学研究グループ
（〒444–8787　愛知県岡崎市明大寺町字東山 5–1）
Division of Cell Signaling, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, Japan
（5–1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi, 444–8787, Japan）
Thermal Biology Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems, National Institutes of Natural Sciences, Japan
（5–1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi, 444–8787, Japan）

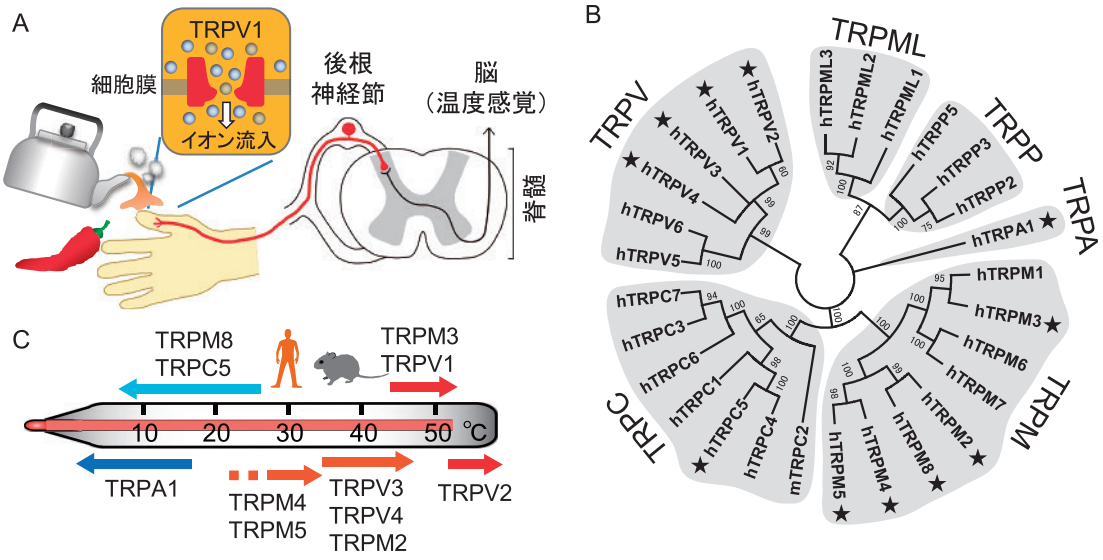


図 1：温度受容における TRP チャネルの役割
（A）温度受容のシグナル伝達経路．一次感覚神経に存在する TRP チャネルが温度刺激により開口し，神経細胞内に陽イオンを流入させる．ヒトやげっ歯類の TRPV1 は 43℃以上の高温だけでなく，唐辛子の辛み成分であるカプサイシンによっても活性化される．（B）ヒトの TRP チャネルの分子系統樹．ヒトやげっ歯類では TRP 遺伝子ファミリーは 28 種類ほどのメンバーで構成され，そのうち星印を付した 11 種類が温度刺激により活性化される．統計的な信頼性を表すブートストラップ値を系統樹の各節に示している．TRPC2 はヒトでは偽遺伝子化しているためマウスのチャネルを用いた．（C）ヒトやげっ歯類の温度感受性 TRP チャネルが受容する温度．矢印の開始点は各 TRP チャネルが活性化され始める温度（活性化温度閾値）を示す．

に適応し，地球上のほとんどの地域に分布を広げてきた．多様な環境へ適応する進化過程で様々な生理機能が変化し，生存可能な温度域が生物種間で変化してきたと考えられる．生存可能な温度域を測る指標として，個体が正常な姿勢を維持しながら活動できる温度の上限（臨界最高温度，脚注）や下限（臨界最低温度），また，致死温度が多くの動物種で決定され，生息地の温度条件に関連した種差が生じていることが示されてきた（Araujo et al., 2013; Sunday et al., 2011, 2012）．温度耐性の進化的変化には様々な遺伝子が関わってきたと予測され，例えば，不凍タンパク質（津田，山内の稿参照），ヒートショックタンパク質，代謝に関わる酵素などの遺伝子の比較解析が行われ，その進化機構に分子レベルで迫る研究が展開されてきた（Boothby, 2019; M. L. Liao et al., 2019; Tangwancharoen et al., 2018）．

ところで，臨界最高（最低）温度や致死温度は個体がいやおうなしに不適な高温や低温に曝された際の耐性能を表す指標であり，いわば受動的な温度暴露に対する適応機構を反映している．一方で動物は環境の温度を鋭敏に感知し適した温度の場所に移動する，または組織を損傷し得る低温や高温を忌避するなど，行動応答を介した能動的な適応機構も発達させてきた．そのような点を考慮すると温度選択行動および，その制御に欠かせない温度受容機構は温度耐性と協調しつつ多様な環境に適応する進化過程で変化してきたと考えられる．

神経系が発達した動物では環境温度は表皮下に分布する末梢神経で受容され，温度刺激によって生じたシグナルが中枢に伝達される．末梢の感覚神経で発現する TRP チャネルが温度受容体として 1997 年に同定されて以来，マウスなどのモデル生物を用いた研究が盛んに行われ，温度受容の分子機構の解明が飛躍的に進んだ（Caterina et al., 1997; Julius, 2013）．それにより温度受容体を起点とした分子的アプローチにより温度受容機構を種間で比較することが可能となり，様々な動物種を対象にした研究が展開されてきた（Bagriantsev & Gracheva, 2015; Laursen et al., 2015; Saito & Tominaga, 2015, 2017）．本稿では特に，温度受容機構の進化的変化と環境適応のつながりの解明に取り組んだ最新の研究を紹介する．

2. 動物の温度受容の仕組み

動物は表皮の温度変化を介して環境の温度を感じている．脊椎動物では温度は表皮下に分布する一次感覚神経の自由終末によって受容され，物理刺激である温度が電気的なシグナルに変換され，そのシグナルが脊髄を通し脳に伝わり温度感覚が生じる（図 1A）（Julius, 2013; Patapoutian et al., 2003）．温度受容の初期過程で重要な

役割を担う温度受容体の分子実体は長らく不明であったが，高温の受容体として Transient Receptor Potential Vanilloid 1（TRPV1）が 1997 年にラットから初めて同定された（Caterina et al., 1997）．この発見が 2021 年のノーベル医学・生理学賞の受賞対象になったことは記憶に新しい．TRPV1 は当初，唐辛子の辛み成分であるカプサイシンの受容体として同定された．カプサイシンは灼熱感を生じさせることから TRPV1 の高温に対する応答性が調べられ 43℃以上の高温でも活性化されることが明らかとなり，カプサイシンによって灼熱感がもたらされる興味深い生理現象の分子機構が解明された．

TRPV1 の発見を皮切りに，TRP 遺伝子ファミリーに含まれる 11 種類のイオンチャネルが温度受容体として機能することが明らかとなり，特に温度感受性 TRP チャネルと呼ばれている（図 1B）．これらのうち，4 種類が TRPV サブファミリーに，5 種類が TRP melastatin（TRPM）サブファミリーに，1 種類ずつが TRP ankyrin（TRPA）および TRP canonical（TRPC）サブファミリーに含まれる．TRP 遺伝子ファミリーのチャネルには温度受容以外の細胞内シグナル伝達に関わるものも存在することから，進化過程で遺伝子重複によりコピー数が増加し，温度受容体として機能するチャネルが各サブファミリー内で独立に生じてきたと考えられる．

多くの TRP チャネルは非選択的陽イオンチャネルであり，活性化に伴いナトリウムイオンやカルシウムイオンを細胞内に流入させる（図 1A）．一次感覚神経細胞において TRP チャネルを介した陽イオンの流入がトリガーとなり，更に電位依存性ナトリウムチャネルなどが活性化され神経発火につながると考えられている．それぞれの温度感受性 TRP チャネルは活性化される温度が異なり，ヒトやげっ歯類では TRPV1，TRPV2，TRPM3 は高温で，TRPV3，TRPV4，TRPM2，TRPM4，TRPM5 は体温近傍の暖かい温度で活性化される（図 1C）．一方で，TRPM8，TRPA1，TRPC5 は低温で活性化される．これらの TRP チャネルにより哺乳類が受容する温度域がほぼカバーされている（Bandell et al., 2007; Dhaka et al., 2006; Laing & Dhaka, 2016）．ヒトやげっ歯類の TRPA1 の温度感受性については議論があり，低温で活性化されるという報告がある一方で，温度刺激による活性化が認められない，または，低温と高温のどちらでも活性化されるという報告もある（Bandell et al., 2007; Talavera et al., 2020）．一方，鳥類，爬虫類，両生類などの脊椎動物や，昆虫などの無脊椎動物では TRPA1 は低温ではなく，高温により活性化され，魚類のゼブラフィッシュでは低温と高温で活性化されることが知られている（Gracheva et al., 2010; Kurganov et al., 2014; Laursen et al., 2015; Oda et al., 2016; Saito et al., 2014; Saito et al., 2017; Saito et al., 2012; Saito & Tominaga, 2017; Sato et al., 2014; Viswanath et al., 2003）．

また，TRP チャネルは温度だけでなく，機械刺激のような物理刺激や，化学物質でも活性化される特徴を持つ．例えば，TRPV1 は高温とカプサイシンだけでなく酸刺激によっても活性化され，また低温受容体である TRPM8 はミントの成分であるメントールによって活性化される．また，TRPA1 はワサビの辛み成分であるアリルイソチオシアネートや他にも様々な香辛料に含まれる複数の刺激性の化学物質によって活性化される．温度感受性 TRP チャネルは一次感覚神経だけでなく様々な組織で発現し，温度感覚以外の温度に関連した生理機能に関与することも知られている．温度感受性 TRP チャネルの詳細な生理機能については本稿の主眼ではないため他の総説を参照してほしい（Julius, 2013; Laing & Dhaka, 2016; Patapoutian et al., 2003; Talavera et al., 2020；富永真琴＆西田基宏，2019）．

3. 温度ニッチに連動した高温耐性と忌避温度の進化的変化

温度適応機構の解明には生理的，生態的な類似性を保ちつつ異なる温度ニッチに適応した近縁種の比較解析が有効であり，筆者らは無尾両生類を用いた研究を進めてきた（Saito et al., 2016; Saito et al., 2022; Saito et al., 2019; Saito & Tominaga, 2017；齋藤＆富永，2019）．両生類の繁殖には水場が必要不可欠であるが，産卵する季節や利用する水場の環境が種間で異なる．例えば，ニホンアカガエルは早春の氷が張るような寒冷期，シュレーゲルアオガエルは春，カジカガエル，ツチガエル，リュウキュウカジカガエルは春から盛夏にかけて産卵する（図 2A）．リュウキュウカジカガエルは温暖な南西諸島に分布し，それ以外の 4 種は本州，四国，九州に広く分布し同所的に生息する．繁殖期や産卵する水場の環境の違いにより，これらの種の幼生は異なる温度ニッチに適応してきたと考えられる．そこで幼生が経験する温度を調べるため，生息地での継時的な水温計測を行ったところ，涼しい時期に成長するニホンアカガエルのような種は高温をほとんど経験することがないのに対して，浅い水たまりに盛夏にも産卵するリュウキュウカジカガエルは日射が強い時間帯に 40℃近くの高水温に曝されることが分かった（Saito et al., 2022）．

そこで，これら 5 種の高温耐性および忌避温度を比較

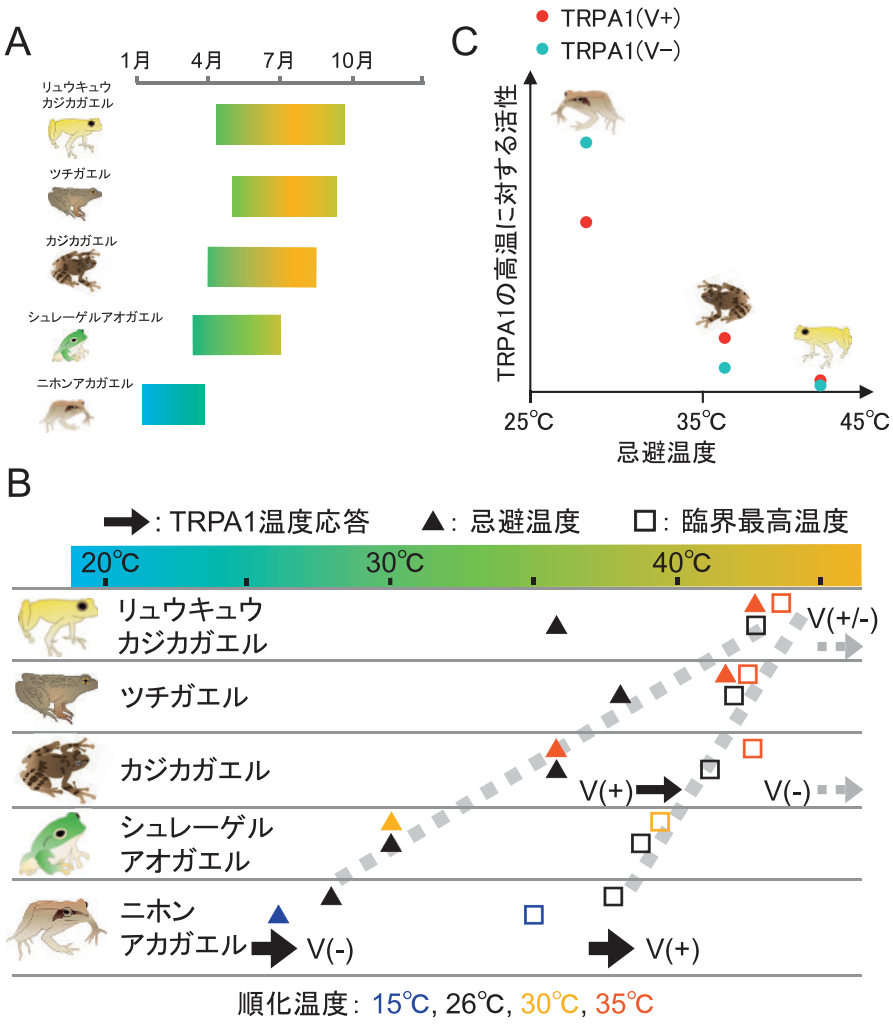


図 2：無尾両生類の温度応答特性の種間比較
（A）日本在来の 5 種の無尾両生類の繁殖時期．（B）5 種の無尾両生類の臨界最高温度，忌避温度，TRPA1 の比較．順化温度（飼育温度）によって臨界最高温度および忌避温度が変化するため異なる色で示している．TRPA1 の活性化温度閾値と活性の強さを矢印で示した．矢印が太いほど活性が大きく，灰色の矢印は活性がほぼ失われていることを表す．無尾両生類は 1 つのバリン残基が異なる 2 種類の TRPA1 スプライシングバリアントを保有しており，バリン挿入型を V（+），非挿入型を V（−）と表示している．ニホンアカガエルでは 2 種類の TRPA1 スプライシングバリアントの活性化温度閾値が大きく異なり，活性化温度閾値が低い TRPA1（V−）が高温応答行動に大きく寄与すると推測される．忌避温度が低いニホンアカガエルの TRPA1（V−）の活性化温度閾値はカジカガエルの TRPA1（V+）より 13℃ほど低かった．（C）3 種の無尾両生類の TRPA1（V+）と TRPA1（V−）の高温応答の比較．忌避温度が低い種ほど TRPA1 の高温に対する活性が大きい．リュウキュウカジカガエルの TRPA1（V+）と TRPA1（V−），カジカガエルの TRPA1（V−）は 45℃ほどの高温刺激を加えてもほとんど応答しなかった．

した．高温耐性の指標として，オタマジャクシが正常な姿勢で遊泳できる温度の上限（臨界最高温度，脚注）を決定したところ，5 種間で生息地の温度条件から予測される順序で違いが生じていた（図 2B）．次に忌避温度を種間で比較した．2 つの円形のチャンバーを細い通路でつないだ容器を作製し，それぞれのチャンバーを異なる温度に設定し，オタマジャクシが各チャンバーに滞在する時間を計測することにより忌避温度を決定した．その結果，臨界最高温度と相関した種差が認められ，これらの 2 つの要素が生息地の温度環境に連動して変化してきたことが分かった．忌避温度の種差は臨界最高温度の種差より 2.6 倍ほど大きく，更に，2 つの要素の関係性が種間で異なっていた．ニホンアカガエルやシュレーゲルアオガエルの幼生では忌避温度は臨界最高温度よりもずっと低いのに対して，リュウキュウカジカガエルやツチガエルの幼生では忌避温度は臨界最高温度より僅かに

低い温度であった（図 2B）．すなわち，高温に曝される機会が多い種では，進化過程で増強させた耐性能を最大限に活用できるように忌避温度が設定されており，一方で涼しい環境に適応した種では忌避温度は臨界最高温度よりもずっと低く保守的に設定されていることが明らかとなった（Saito et al., 2022）．

4. 環境適応に関連した温度感受性 TRP チャネルの機能進化

感覚神経において温度センサー分子としてはたらく TRP チャネルの機能変化は温度感覚の種間多様性を生み出してきたと考えられる．無尾両生類において高温忌避応答の種間差を生み出した分子基盤を解明するため，高温センサー分子として機能する TRPA1 を忌避温度が最高，中程度，最低であったリュウキュウカジカガエル，カジカガエル，ニホンアカガエルから単離し比較した（Saito et al., 2022）．これら 3 種は多くの脊椎動物が保有する既知の TRPA1 転写産物に加え，既知の TRPA1 転写産物の 277 番目に 1 つのバリン残基が挿入されるだけの新規のスプライシングバリアントを保有しており，バリン挿入型を TRPA1（V＋），非挿入型を TRPA1（V－）と命名した．興味深いことに 2 種類の TRPA1 スプライシングバリアントの温度応答特性は種ごとに異なっていた．ニホンアカガエルではどちらの TRPA1 も高温によって活性化された．カジカガエルでは TRPA1（V＋）は高温によって活性化されるが，TPPA1（V－）はほとんど活性化されなかった．リュウキュウカジカガエルではどちらの TRPA1 スプライシングバリアントも高温に対する活性がほとんど失われていた．TRPA1 の高温に対する活性をスプライシングバリアントごとに比較したところ，どちらの場合も忌避温度が最も低いニホンアカガエルでは TRPA1 の高温に対する活性が高く，一方で忌避温度が最も高いリュウキュウカジカガエルでは TRPA1 の高温応答はほとんど認められなかった．忌避温度が中程度のカジカガエルでは TRPA1 の高温に対する活性はリュウキュウカジカガエルとニホンアカガエルの間に位置していた（図 2C）．また，ニホンアカガエルの TRPA1 スプライシングバリアントはどちらも高温で活性化されるがその活性化温度閾値（活性化され始める温度）は 12℃ほど異なっていた（図 2B）．ニホンアカガエル TRPA1（V－）の活性化温度閾値はこれまで調べられた種のなかで最も低く，カジカガエルにおいて活性を保持している TRPA1（V＋）よりも 13℃ほど低かった．ニホンアカガエルのように低温環境に適応した種は TRPA1 の温度応答性が高く維持されているため高温刺激をより強く受容し，鋭敏に忌避すると考えられる．

筆者らは生息地の温度環境と連動した TRPA1 の機能差をアフリカに生息するツメガエルにおいても見出している．温度条件が異なる生息地に分布する 4 種のツメガエルを比較したところ，涼しい地域に生息する 2 種では TRPA1 の高温に対する活性が大きく，暑い地域に生息する 2 種では小さいことを明らかにした（図 3）（Saito et al., 2016; Saito et al., 2019; Saito & Tominaga, 2017）．更に，爬虫類においても温度ニッチと関連した TRPA1 の機能差が報告されている．同所的に分布し利用する微小環境が異なる 3 種のアノールトカゲを用いた比較解析において TRPA1 の活性化温度閾値が高温を好む種と，中温および低温を好む種の間で異なることが報告されている（Akashi et al., 2018）．

TRPV1 の温度応答特性も生息地の環境に応じて変化してきたと考えられる．砂漠のような高温環境に適応したラクダの TRPV1 は高温に対する活性がほぼ失われている（Laursen et al., 2016）．一方，寒冷な環境に適応しているサケ科に属するアマゴの TRPV1 の活性化温度閾値は約 29℃であり，40℃以上で活性化される哺乳類やツメガエルの TRPV1 と比較して著しく低いことが分かった（Yoshimura et al., 2022）．同様に，冷涼環境に生息するメキシコサンショウウオの TRPV1 の活性化温度閾値も約 31℃と低いことが知られている（Hori & Saitoh, 2020）．冷涼な環境に生息する種は高温暴露に脆弱であるため TRPV1 の温度感受性が高く維持されていると考えられる．

5. 低温受容体の機能進化と環境適応

低温センサー分子である TRPM8 にも生息環境と関連した違いが生じている．TRPM8 の低温に対する活性を哺乳類と鳥類の複数種で比較したところ，生息地の温度条件に応じた種差が存在し，温暖な地域に生息するアフリカゾウでは活性が最も高く，南極に生息するコウテイペンギンでは活性がほぼ喪失していることが報告された．更にコウテイペンギンの TRPM8 をマウスに導入した個体は低温忌避行動が減弱し，TRPM8 の機能が失われたノックアウトマウスと類似した温度選択行動を示すことが明らかとなった（Yang et al., 2020）．これらの結果は TRPM8 の低温応答特性の変化は実際に個体レベルの温度応答行動を変化させることを示している．

また，冬眠する恒温動物であるシリアンハムスターおよびジュウサンセンジリスでも TRPM8 の低温に対す

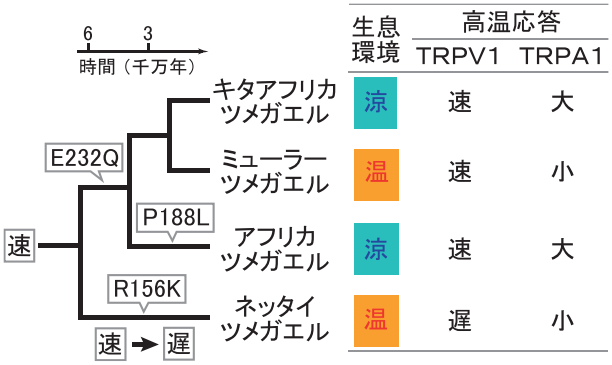


図 3：ツメガエルの高温センサーの温度応答特性の種間比較
温度条件が異なる地域に生息する 4 種のツメガエルの TRPA1 および TRPV1 の温度応答特性を比較した．TRPA1 の高温に対する活性は生息環境に関連した違いが生じていた．一方，TRPV1 の繰り返しの高温刺激に対する反応はネッタイツメガエルで遅く，他の 3 種では速いことからネッタイツメガエルに至る進化系統で変化したと推測される．アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの TRPV1 の高温応答特性の違いに関わる 3 つのアミノ酸置換（E232Q，P188L，R156K）が生じた時期を系統樹に示した．数字は TRPV1 におけるアミノ酸の位置，アルファベットはアミノ酸の種類を表す．例えば，E232Q は TRPV1 の 232 番目の座位においてグルタミン酸（E）からグルタミン（Q）へアミノ酸が変化したことを表す．3 つのアミノ酸置換のなかで TRPV1 の高温応答特性が変化した時期に生じた変化は 1 つだけであった（R156K）．

る活性が著しく低下しており，加えてジュウサンセンジリスでは TRPV1 の高温に対する活性も減弱していることが報告された（Laursen et al., 2016; Matos-Cruz et al., 2017）．TRPM8 の温度応答性の喪失は冬眠機構の獲得に伴った現象であるという仮説が提唱されているが，比較対象の種が限られているため他の冬眠哺乳動物や近縁な非冬眠哺乳動物を用いた詳細な比較解析が必要である．

極端な低温を経験する種における TRPM8 の温度応答性の減弱は，高温環境に適応したリュウキュウカジカガエルの TRPA1 やラクダの TRPV1 の高温活性がほぼ失われている現象と類似しており，極限環境に適応した種ではセンサー分子の温度応答性を落とし，末梢から入力される刺激強度を低減させるような適応進化機構が存在することを示唆している．興味深いことに，いずれの種においても温度応答以外のチャネル機能は維持されている．コウテイペンギンおよびジュウサンセンジリスの TRPM8 はメントールで活性化される（Matos-Cruz et al., 2017; Yang et al., 2020）．ラクダやジュウサンセンジリスの TRPV1 はカプサイシンに，リュウキュウカジカガエルの TRPA1 はシンナムアルデヒド（シナモンに含まれる刺激性の化学物質）に対する活性が維持されている（Laursen et al., 2016; Saito et al., 2022）．これらの現象は TRP チャネルの機能のなかでも温度応答特性に自然選択が特異的に働いたことを意味している．

上述のように恒温動物では低温環境への適応進化に TRPM8 が関与してきたことを支持する結果が得られているが，変温動物ではそのような研究例は現時点では報告されていない．至適温度が異なるネッタイツメガエルとアフリカツメガエルの間で TRPM8 の温度応答特性が比較されたが 2 種間で違いは認められなかった（Myers et al., 2009）．筆者らが行った無尾両生類を用いた行動解析では，寒冷環境に適応したニホンアカガエルの幼生は 10℃ 以下の温度を生息地で経験するが 10℃ を明瞭に忌避した．また，ツチガエルの幼生は越冬できるため高い低温耐性を有していると予測されるが，室温より僅かに低い 22℃ を明瞭に忌避した（Saito et al., 2022）．変温動物は環境温度の低下に伴い採餌や，捕食者からの逃避などの生存に欠かせない運動機能が低下するため低温環境に留まることは適応的に不利であると推測される．そのため低温側の忌避温度は，実際に耐えることができる温度よりも高く設定されているのかもしれない．一方で，恒温動物は，冬眠機構を獲得した種を除けば，低温環境でも活動を維持する必要があるため低温受容を減弱させる変化は適応的であるのかもしれない．

6. 温度適応に関連した TRP チャネルの機能進化の構造基盤

温度適応の進化過程において TRP チャネルのどのアミノ酸置換により温度応答特性が変化したのか，また，それによってどのような構造的変化が生じたのかは興味が持たれる．TRP チャネルは 4 つのサブユニットにより構成される．1 つのサブユニットは 6 個の膜貫通ドメインを持ち，第 5 および第 6 膜貫通ドメインの間にポアドメインが存在し，4 つのサブユニットの中心にイオンが透過するポアが形成される（図 4）．N 末端および C 末端側の領域は細胞内に位置し，TRPV，TRPC および TRPA サブファミリーのチャネルには N 末端側にアンキリンリピートドメインと呼ばれる細胞内のドメインが複数存在し，C 末端側は N 末端側の領域と相互作用している（Cao et al., 2013; Gao et al., 2016; M. Liao et al., 2013; Paulsen et al., 2015）．

本稿で紹介した研究において TRP チャネルの温度応答特性を変えるアミノ酸置換が幾つか特定されている．高温に対する活性が異なるジュウサンセンジリスとラットの TRPV1 の比較により，細胞内のアンキリンリピートドメインの 2 つのアミノ酸置換が種差に関与すること

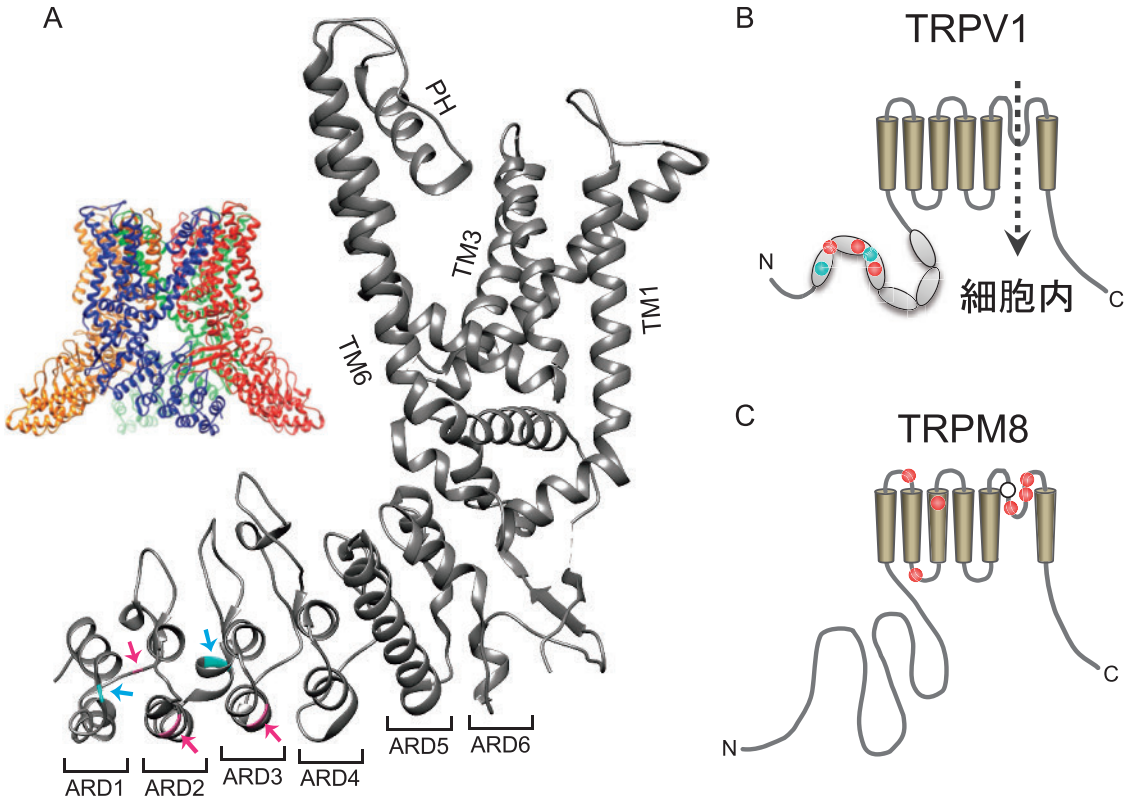


図 4：TRPV1 および TRPM8 の温度応答特性の種間差に関与するアミノ酸の位置
（A，B）ラット TRPV1 の立体構造と模式図．1 つのサブユニット（A 右）と 4 量体の立体構造（A 左）．ジュウサンセンジリスとラット（シアン），または，ネッタイツメガエルとアフリカツメガエル（マゼンタ）の TRPV1 温度応答特性の種差に関わるアミノ酸の位置を示した（A，B）．（C）ジュウサンセンジリスとラット（マゼンタ），および，アフリカゾウとコウテイペンギン（白）の TRPM8 の温度応答特性の種差に関わるアミノ酸の位置．ARD：アンキリンリピートドメイン，TM：膜貫通ドメイン，PH：ポアヘリックスドメイン．楕円および筒状の構造はそれぞれアンキリンリピートドメインおよび膜貫通ドメインを表す．

が報告されている（図 4A，B）（Laursen et al., 2016）．また，至適温度が異なるネッタイツメガエルとアフリカツメガエルにおいても TRPV1 の繰り返しの高温刺激に対する応答性が異なり，その違いにアンキリンリピートドメインの 3 つのアミノ酸置換が部分的に関与することを筆者らは明らかにした（図 3，図 4）（Saito et al., 2016）．リュウキュウカジカガエル，カジカガエル，ニホンアカガエルの TRPA1 の 2 種類のスプライシングバリアントの差異は 6 番目と 7 番目のアンキリンリピートドメインの間に挿入される 1 つのバリン残基のみであり，この部位が温度応答特性に大きな影響を与えることが明らかになった（Saito et al., 2022）．しかし，このバリンだけでは 3 種間の TRPA1 の機能差を説明できないことからバリンと相互作用する未同定のアミノ酸が種間で変化することにより温度応答特性の種間差が生み出されてきたと推測される．TRPM8 ではジュウサンセンジリスとラットの比較解析により，膜貫通ドメインおよびそれらをつなぐループ領域に分散する 6 個のアミノ酸置換が温度応答特性の違いに関与することが報告された（図 4C）（Matos-Cruz et al., 2017）．また，コウテイペンギンとアフリカゾウの TRPM8 の温度応答性の種差にはポアドメインに位置する 1 つのアミノ酸置換が関与しており（図 4C），更にポアドメインを構成するアミノ酸の疎水性の度合いが高い種ほど低温に対する活性が高い傾向があることが示されている（Yang et al., 2020）．

それでは，これらの研究で同定されたアミノ酸置換が進化過程において TRP チャネルの機能変化を実際に生み出してきたのだろうか．ジュウサンセンジリスの TRPV1 の例では，ラットとの比較で同定された 2 つのアミノ酸を他の種で比べた場合，TRPV1 の高温応答性が維持されている複数種においてジリスと同じ種類のアミノ酸が保持されていた．つまり，2 つのアミノ酸置換はラットにいたる進化系統で生じたことを意味しており，ジリスの進化系統で TRPV1 の温度応答性の喪失に関わったアミノ酸置換ではないことが分かる（Laursen et al., 2016）．またツメガエルの TRPV1 の場合は，温度応答性の変化はネッタイツメガエルに至る系統で生じたが，上述の 3 つのアミノ酸置換のうちネッタイツメガエ

ルの進化系統で生じたアミノ酸置換は1つだけであり，残りの2つはTRPV1の温度応答特性が変化していない進化系統で生じたことが分かっている（図3）（Saito et al., 2019）．このように進化過程で機能変化に関与したアミノ酸置換を特定する際には複数の近縁な現生種を比較したうえで祖先状態を考慮し変化が生じた時期を調べる必要がある（Dean & Thornton, 2007; Yokoyama, 2013）．

環境適応に関連したTRPチャネルの温度応答性の変化にはチャネル構造の様々な部位に生じたアミノ酸が関与しており，また僅かな数のアミノ酸置換で大きく変化し得ることが分かってきた．今後，詳細な種間比較解析や突然変異体チャネル解析，更には低温電子顕微鏡などを用いた構造解析が進むことで環境適応に関連した温度センサーの機能変化の分子メカニズムがより深く解明されるだろう．

7. 今後の展望

本稿で紹介した研究ではほとんどの場合TRPチャネルの温度応答特性と温度応答行動の相関関係を示す段階に留まっており，TRPチャネルの機能変化が実際に個体レベルの行動応答の変化につながるのかは検証されていない．近年，様々な種でゲノム編集が可能となってきたため今後は遺伝子改変動物を用いた実証的な研究が進んでいくだろう．末梢のセンサー分子の機能変化は，他の生理機能に影響を与えずに温度感覚を変化させるため，温度適応の標的分子として進化過程で利用されやすいと考えられる．しかし，末梢から中枢に至るまでのシグナル伝達経路や中枢での情報処理の変化により温度感覚の種間差が生み出されてきたことも十分に考えられる．今後，温度受容の異なる階層に関わる遺伝子を対象にした研究が発展し，温度適応機構の統合的な理解が進むことが望まれる．

謝辞

執筆にあたりご助言をいただいた生理学研究所の齋藤くれあ特任研究員，橋本照美技術支援員，また研究を進めるにあたり多くの支援をいただいた富永真琴教授に感謝申し上げます．

脚注

臨界最高（最低）温度：環境の温度を徐々に上昇（または下降）させた際に個体が平衡感覚を喪失し，ふらつく，または，ひっくり返るなど正常な姿勢で行動できなくなる温度．オタマジャクシの場合は水温を上昇させていく過程でふらつく，または仰向けに泳ぐなどの行動が生じた温度を臨界最高温度として決定した．

参考文献

Akashi, H. D., Saito, S., Cadiz Diaz, A., Makino, T., Tominaga, M., & Kawata, M. (2018). Comparisons of behavioural and trpa1 heat sensitivities in three sympatric cuban *anolis* lizards. *Mol Ecol,* **27**(9), 2234–2242. doi:10.1111/mec.14572

Araujo, M. B., Ferri-Yanez, F., Bozinovic, F., Marquet, P. A., Valladares, F., & Chown, S. L. (2013). Heat freezes niche evolution. *Ecol Lett,* **16** (9), 1206–1219. doi: 10.1111/ele.12155

Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2015). Molecular mechanisms of temperature adaptation. *J Physiol,* **593**(16), 3483–3491. doi:10.1113/jphysiol.2014.280446

Bandell, M., Macpherson, L. J., & Patapoutian, A. (2007). From chills to chilis: Mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermotrps. *Curr Opin Neurobiol,* **17**(4), 490–497. doi:S0959-4388(07)00097-9 [pii] 10.1016/j.conb.2007.07.014

Boothby, T. C. (2019). Mechanisms and evolution of resistance to environmental extremes in animals. *Evodevo,* **10**, 30. doi: 10.1186/s13227-019-0143-4

Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., & Julius, D. (2013). Trpv1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature,* **504**(7478), 113–118. doi:10.1038/nature12823

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature,* **389**(6653), 816–824. doi:10.1038/39807

Dean, A. M., & Thornton, J. W. (2007). Mechanistic approaches to the study of evolution: The functional synthesis. *Nat Rev Genet,* **8** (9), 675–688. doi: 10.1038/nrg2160

Dhaka, A., Viswanath, V., & Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci,* **29**, 135–161. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958

Gao, Y., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2016). Trpv1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature,* **534** (7607), 347–351. doi: 10.1038/nature17964

Gracheva, E. O., Ingolia, N. T., Kelly, Y. M., Cordero-Morales, J. F., Hollopeter, G., Chesler, A. T., . . . Julius, D. (2010). Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature,* **464**(7291), 1006–1011. doi:nature08943 [pii] 10.1038/nature08943

Hori, S., & Saitoh, O. (2020). Unique high sensitivity to heat of

axolotl trpv1 revealed by the heterologous expression system. *Biochem Biophys Res Commun,* **521**(4), 914–920. doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.203

Julius, D. (2013). Trp channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol,* **29**, 355–384. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833

Kurganov, E., Zhou, Y., Saito, S., & Tominaga, M. (2014). Heat and aitc activate green anole trpa1 in a membrane-delimited manner. *Pflugers Arch,* **466**(10), 1873–1884. doi: 10.1007/s00424-013-1420-z

Laing, R. J., & Dhaka, A. (2016). Thermotrps and pain. *Neuroscientist,* **22**(2), 171–187. doi:10.1177/1073858414567884

Laursen, W. J., Anderson, E. O., Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2015). Species-specific temperature sensitivity of trpa1. *Temperature (Austin),* **2** (2), 214–226. doi: 10.1080/23328940.2014.1000702

Laursen, W. J., Schneider, E. R., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2016). Low-cost functional plasticity of trpv1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **113**(40), 11342–11347. doi:10.1073/pnas.1604269113

Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013). Structure of the trpv1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature,* **504**(7478), 107–112. doi: nature12822 [pii] 10.1038/nature12822

Liao, M. L., Somero, G. N., & Dong, Y. W. (2019). Comparing mutagenesis and simulations as tools for identifying functionally important sequence changes for protein thermal adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **116**(2), 679–688. doi:10.1073/pnas.1817455116

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. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.083

Myers, B. R., Sigal, Y. M., & Julius, D. (2009). Evolution of thermal response properties in a cold-activated trp channel. *PLoS One,* **4**(5), e5741. doi:10.1371/journal.pone.0005741

Oda, M., Kurogi, M., Kubo, Y., & Saitoh, O. (2016). Sensitivities of two zebrafish trpa1 paralogs to chemical and thermal stimuli analyzed in heterologous expression systems. *Chem Senses,* **41**(3), 261–272. doi:10.1093/chemse/bjv091

Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003). Thermotrp channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci,* **4**(7), 529–539. doi:10.1038/nrn1141 nrn1141 [pii]

Paulsen, C. E., Armache, J. P., Gao, Y., Cheng, Y., & Julius, D. (2015). Structure of the trpa1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature,* **520**(7548), 511–517. doi:10.1038/nature14367

Saito, S., Banzawa, N., Fukuta, N., Saito, C. T., Takahashi, K., Imagawa, T., . . . Tominaga, M. (2014). Heat and noxious chemical sensor, chicken trpa1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol Biol Evol,* **31**(3), 708–722. doi:msu001 [pii] 10.1093/molbev/msu001

Saito, S., Hamanaka, G., Kawai, N., Furukawa, R., Gojobori, J., Tominaga, M., . . . Satta, Y. (2017). Characterization of trpa channels in the starfish *patiria pectinifera*: Involvement of thermally activated trpa1 in thermotaxis in marine planktonic larvae. *Sci Rep,* **7**(1), 2173. doi:10.1038/s41598-017-02171-8

Saito, S., Nakatsuka, K., Takahashi, K., Fukuta, N., Imagawa, T., Ohta, T., & Tominaga, M. (2012). Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (trpa1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with trp vanilloid 1 (trpv1) in ancestral vertebrates. *J Biol Chem,* **287**(36), 30743–30754. doi:M112.362194 [pii] 10.1074/jbc.M112.362194

Saito, S., Ohkita, M., Saito, C. T., Takahashi, K., Tominaga, M., & Ohta, T. (2016). Evolution of heat sensors drove shifts in thermosensation between xenopus species adapted to different thermal niches. *J Biol Chem,* **291**(21), 11446–11459. doi:10.1074/jbc.M115.702498

Saito, S., Saito, C. T., Igawa, T., Takeda, N., Komaki, S., Ohta, T., & Tominaga, M. (2022). Evolutionary tuning of transient receptor potential ankyrin 1 underlies the variation in heat avoidance behaviors among frog species inhabiting diverse thermal niches. *Mol Biol Evol,* **39**(9). doi:10.1093/molbev/msac180

Saito, S., Saito, C. T., Nozawa, M., & Tominaga, M. (2019). Elucidating the functional evolution of heat sensors among *xenopus* species adapted to different thermal niches by ancestral sequence reconstruction. *Mol Ecol,* **28**(15), 3561–3571. doi:10.1111/mec.15170

Saito, S., & Tominaga, M. (2015). Functional diversity and evolutionary dynamics of thermotrp channels. *Cell Calcium,* **57**(3), 214–221. doi:10.1016/j.ceca.2014.12.001

Saito, S., & Tominaga, M. (2017). Evolutionary tuning of trpa1 and trpv1 thermal and chemical sensitivity in vertebrates. *Temperature (Austin),* **4**(2), 141–152. doi:10.1080/23328940.2017.1315478

Sato, A., Sokabe, T., Kashio, M., Yasukochi, Y., Tominaga, M., & Shiomi, K. (2014). Embryonic thermosensitive trpa1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **111**(13), E1249–1255. doi:10.1073/pnas.1322134111

Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc Biol Sci,* **278**(1713), 1823–1830. doi:10.1098/rspb.2010.1295

Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change,* **2**(9), 686–690. doi:10.1038/Nclimate1539

Talavera, K., Startek, J. B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., . . . Nilius, B. (2020). Mammalian transient receptor potential trpa1 channels: From structure to disease. *Physiol Rev,* **100**(2), 725–803. doi:10.1152/physrev.00005.2019

Tangwancharoen, S., Moy, G. W., & Burton, R. S. (2018). Multiple modes of adaptation: Regulatory and structural evolution in a small heat shock protein gene. *Mol Biol Evol,* **35**(9), 2110–2119. doi:10.1093/molbev/msy138

Viswanath, V., Story, G. M., Peier, A. M., Petrus, M. J., Lee, V. M., Hwang, S. W., . . . Jegla, T. (2003). Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature,* **423**(6942), 822–823. doi:10.1038/423822a

Yang, S., Lu, X., Wang, Y., Xu, L., Chen, X., Yang, F., & Lai, R. (2020). A paradigm of thermal adaptation in penguins and elephants by tuning cold activation in trpm8. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **117**(15), 8633–8638. doi:10.1073/pnas.1922714117

Yokoyama, S. (2013). Synthetic biology of phenotypic adaptation in vertebrates: The next frontier. *Mol Biol Evol,* **30**(7), 1495–1499. doi:10.1093/molbev/mst075

Yoshimura, A., Saito, S., Saito, C. T., Takahashi, K., Tominaga, M., & Ohta, T. (2022). Functional analysis of thermosensitive trpv1 in an aquatic vertebrate, masu salmon (oncorhynchus masou ishikawae). *Biochem Biophys Rep,* **31**, 101315. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101315

富永真琴＆西田基宏.（2019）. *Trp* チャネルのすべて（Vol. 270）：医歯薬出版株式会社.

齋藤茂＆富永真琴.（2019）. 温度センサー trp チャネルの生息環境に応じた機能進化とその構造基盤. 生物物理, **59**（1）, 005–008. doi:10.2142/biophys.59.005

低温科学 81 （2023） 81-88
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 81

冬眠しないトガリネズミの越冬戦略

大舘　智志[1)]

2022 年 12 月 20 日受付，2022 年 12 月 28 日受理

北海道などの寒冷地域に生息し冬季間も活動するトガリネズミ類の越冬生態について概観した．トガリネズミ類はおもに土壌表面や土壌中に生息している小型無脊椎動物を食べている．トガリネズミ類では冬期には餌資源量の減少が考えられるが，ある程度の安定した餌の供給は保たれていると考えられている．またトガリネズミ類では冬期には一旦，体サイズや頭骨サイズが縮小し，越冬後に急激にサイズが増大する．この現象はデーネル現象と言われており，トガリネズミ類の越冬生態と密接に関わっていると思われるが，そのメカニズムはほとんど解明されていない．

Wintering strategy of soricine shrews, which do not hibernate

Satoshi D. Ohdachi[1]

Wintering ecology of soricine shrews, which are active in winter in cold regions, was reviewed. Shrews mainly feed on small invertebrates on and in soil. Food resource for shrews seems to be reduced in winter but stable food supply may be maintained during winter. Sizes of body and skull tend to become smaller in winter of the birth year and then rapidly become larger toward summer in soricine shrews. It is called Dehnel's phenomenon and seems to be related to their wintering ecology, but the mechanism to explain it has not been clarified.

キーワード：トガリネズミ・デーネル現象・代謝率・越冬・餌資源
soricine shrew, Dehnel's phenomenon, metabolic rate, wintering, food resource

1．はじめに

餌資源獲得に注目すると哺乳類が越冬するには３つの選択肢がある．（1）暖かく餌が豊富な地域に移動しそこで越冬する，（2）エネルギー消費を制限するために冬眠をしたり，不活発な時間を増加させて餌の摂取量を下げる，（3）耐寒対策をして餌を摂取し続け冬を越す．（1）は移動能力の高い大型哺乳類では可能であるが，体が小さく移動能力が限られている非飛翔性の小型哺乳類では冬眠するか，その場で餌を食べ続けて活動するかの越冬戦略をとっている．小型哺乳類は定義上，体が小さいので気温や湿度などの環境変化や飢餓に弱いとされ（Merritt, 2010），中緯度よりも高緯度に生息する小型哺乳類にとって越冬は生存上もっとも重要な課題の一つである．ここで小型哺乳類とはおおよそ５キログラム以下の哺乳類をさす便宜的な呼称であり（Merritt, 2010），日本では齧歯目（ネズミ類とリス類），兎形目（ウサギ類），真無盲腸目（トガリネズミ類とモグラ類など），翼手目（コウモリ類）や小型の食肉目のイタチ科などが含まれる（Ohdachi et al., 2015）．

北海道のほとんどの場所では冬季には気温が低く積雪があり，北海道は日本では典型的な寒冷地とされている．

連絡先
大舘　智志
北海道大学低温科学研究所
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011-706-7474
e-mail：ohd@lowtem.hokudai.ac.jp

1）札幌市北区北 19 条西 8 丁目　北海道大学低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Kita-19 Nishi-8, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan

北海道には小型哺乳類として9種のネズミ類（住家棲3種も含む），3種のリス類，3種のウサギ類（外来種1種も含む），5種のトガリネズミ類と20種のコウモリ類，6種の陸棲イタチ類（移入種3種も含む）の46種が生息している（Ohdachi et al., 2015）．この内，冬眠するのはリス科のシマリス *Tamias sibiricus*（川道美枝子，2000）とコウモリ類である（川道武男，2000；船越，2020）．ただしコウモリ類については，最近，札幌市において12月から2月の厳冬期の野外でコウモリ類の音声が記録されることがわかり，冬眠中も時々覚醒し活動をしていることが示唆されている（河合久仁子，私信：2022年度日本哺乳類学会大会ポスター発表）．また北海道を代表する大型獣であるヒグマ *Ursus arctos* も冬眠する（坪田，2000，2011；坪田，下鶴の稿参照）．北海道のアカネズミ *Apodemus speciosus* は冬眠はしないが，冬期に日内休眠を行うことが知られている（森田，2000）．以上のようにコウモリ類とシマリスを除く北海道の小型哺乳類は厳冬期でも餌を摂取し活動している．北海道における冬眠しない小型哺乳類は，アカネズミ，ハントウアカネズミ *Apodemus peninsulae*，ヒメネズミ *A. argenteus*，タイリクヤチネズミ *Craseomys rufocanus*，ムクゲネズミ *C. rex*，ヒメヤチネズミ *Myodes rutilus*，住家棲ネズミ類（ドブネズミ *Rattus norvegicus*，クマネズミ *R. rattus*，ハツカネズミ *Mus musculus*），キタリス *Sciurus vulgaris*，タイリクモモンガ *Pteromys volans*，ユキウサギ *Lepus timidus*，キタナキウサギ *Ochotona hyperborea*，アナウサギ *Oryctolagus cuniculus*（渡島小島に生息する移入種），クロテン *Martes zibellina*，ニホンテン *Martes melampus*（国内移入種），ニホンイタチ *Mustela itatsi*（国内移入種），アメリカミンク *Neovison vison*（移入種），オコジョ *Mustela erminea*，イイズナ *Mustera nivalis*，オオアシトガリネズミ *Sorex unguiculatus*，バイカルトガリネズミ *S. caecutiens*，ヒメトガリネズミ *S. gracillimus*，チビトガリネズミ *S. minutissimus*，ニホンジネズミ *Crocidura dsinezumi*（江戸時代以前の移入種と思われる）の合計25種となる（阿部，2005；Ohdachi et al., 2015）．

冬眠する北海道の20種のコウモリ類の主な餌は昆虫類であるが（Ohdachi et al., 2015；船越，2020），冬眠中に覚醒しても餌はほとんどないと思われるのでなぜ覚醒するのか謎である（佐藤の稿参照）．冬眠するシマリスは貯食も同時に行うことが知られ（川道美枝子，2000；塚本の稿参照），近縁のトウブシマリス *Tamias striatus* では冬眠期間中の覚醒時に摂食することが確認されている（French 2000）．またネズミ類，リス類，ウサギ類は基本的に植物食であるが（Ohdachi et al., 2015；中田，2021），アカネズミ，エゾヤチネズミやリス類は昆虫などの動物質も食することがある．冬眠しないアカネズミ（中田，2021；島田，2022），キタリス（林田，1988）やキタナキウサギ（Kawamichi, 1971；川道，1994）などは葉や種子などを貯食することにより冬季間の餌の確保を保証している．一方，冬でも活動するトガリネズミ類は昆虫類などの小型無脊椎動物，イタチ類は小型の脊椎動物や無脊椎動物をおもな餌としている（Ohdachi et al., 2015）．動物質の餌は冬期においても長期の貯食には適しておらず，またトガリネズミやイタチ類では長期間の貯食は知られていない．つまり，これらの冬眠しない小型哺乳類は冬季間に生命を維持するために生きた動物を餌として確保しなくてはならない．さらにトガリネズミ類は厳冬期の終わり頃に性成熟の準備をし始め，春に一斉に繁殖を開始するので（Churchfield, 1990; Ohdachi and Maekawa, 1990a, Bellocq and Smith, 2003），生命を維持するだけでなくて生殖活動を開始するための準備も必要であり，そのためにも冬期には十分なエネルギー源とタンパク源を確保しなくてはならない．

さてこれらの冬眠しない小型哺乳類の中でも，特にトガリネズミ類は基礎代謝率が高く大量の餌を必要とし，また数時間～6時間程度，餌を食べないと餓死してしまう（Churchfield, 1990; Taylor, 1998）．一方，冬期にはトガリネズミ類の主要な餌である無脊椎動物の現存量が減り餌不足に陥ることが考えられる．このように餌資源獲得の視点でみるとトガリネズミ類の越冬は生存にとってクリティカルなイベントである．またトガリネズミ類では厳冬期に体サイズや頭蓋サイズを一旦減少させ，その後，春に向かって大きくするという哺乳類としては特異な成長パタンを持つことが知られているが，これも彼らの重要な越冬戦略の一つと考えられている．これはデーネル現象（Dehnel's phenomenon）と呼ばれており哺乳類学の視点だけでなく，最近は脳機能の回復の視点からも多くの科学記事などで取り上げられている（Lazaro et al., 2017; Lazaro et al., 2021）．本稿では，高代謝でありながら冬眠せずに厳しい冬を越すトガリネズミ類の越冬生態について概観する．

2. トガリネズミとは：分類と生態について

トガリネズミ類とは，多くの読者にとっては聞き慣れない哺乳類であると思われるので，この章でトガリネズミ類について簡単に説明する．トガリネズミとは広義には真無盲腸目トガリネズミ科の動物のことを示し，齧歯目の“ネズミ”類とは系統的に全く異なる動物である．ト

ガリネズミはかつて食虫目という分類群に属していたが，この分類群は分子系統学の知見により多系統であることが判明し現在では無効となっている．トガリネズミを含む真無盲腸目はコウモリやイヌ，ネコ，ブタ，ウシ，クジラなどを含むローラシア獣類に，“ネズミ”を含む齧歯目は霊長類やウサギ類を含む真主嚙(しんしゅげつ)類という分類群に属している（長谷川，2014，2020）．つまりトガリネズミと“ネズミ”は人間とコウモリと同程度に系統的に離れた動物である．トガリネズミ科にはトガリネズミ亜科，ジネズミ亜科，モリジャコウネズミ亜科の３つの亜科が含まれているが，後二者は近縁な一つの単系統群にまとめられる（Dubey et al., 2007）．トガリネズミ科では，トガリネズミ亜科は 184 種，ジネズミ亜科は 245 種，モリジャコウネズミ亜科は 25 種の合計 454 種が知られており，哺乳類のなかでは２番目に大きな分類群である（Burgin et al., 2020）．そしてトガリネズミ亜科の動物をトガリネズミ類，ジネズミ亜科をジネズミ類と略称され，本稿でもそれに従う．トガリネズミ類は主にユーラシアと北アメリカ（と南アメリカの最北端）の冷涼な地域に，ジネズミ類は主にユーラシアとアフリカの温暖域～熱帯域に，モリジャコウネズミ類はアフリカ中部の熱帯域に分布している（大舘，2011；Neves et al., 2018）．

トガリネズミ類とジネズミ類（とモリジャコウネズミ類）の形態は似ており，尖った鼻先と小さな眼，発達した触毛ヒゲ，前後肢ともに５本の指を持っている（図 1）．トガリネズミ科の動物は一般に小型であり（約 180 g 以下，多くは数十 g 以下），なかには世界最小の哺乳類とされるチビトガリネズミ（トガリネズミ亜科）やコビトジャコウネズミ *Suncus etruscus*（ジネズミ亜科）のように２グラム前後の体重しかない極小の種もいる．トガリネズミ科の動物の寿命は野外では２年を超えることはほとんどない（大舘，2011）．餌は小型節足動物やミミズ，ナメクジなどが主で，中には魚類や両生・爬虫類などを捕食する種もいる（阿部，1985；大舘，2011）．トガリネズミ類（亜科）は一般に基礎代謝率が高く高体温であるが，ジネズミ類（亜科）はこれに比して基礎代謝率は低く体温も低い（Churchfield, 1990; Taylor, 1998）．またトガリネズミ類（亜科）は冬眠したほうが有利と思われるにも関わらず，確実な冬眠は確認されておらず，このことは従来より大きな謎とされている（Lyman, 1982）．さらにトガリネズミ亜科では日内休眠は見られないが，ジャコウネズミ *Suncus murinus* を含むジネズミ亜科では日内休眠は普通に見られる（Taylor, 1998）．ただし著者の知る限り，トガリネズミ類の体温を通年に渡り計測した研究例はないので，冬眠や日内休眠の有無の厳密な

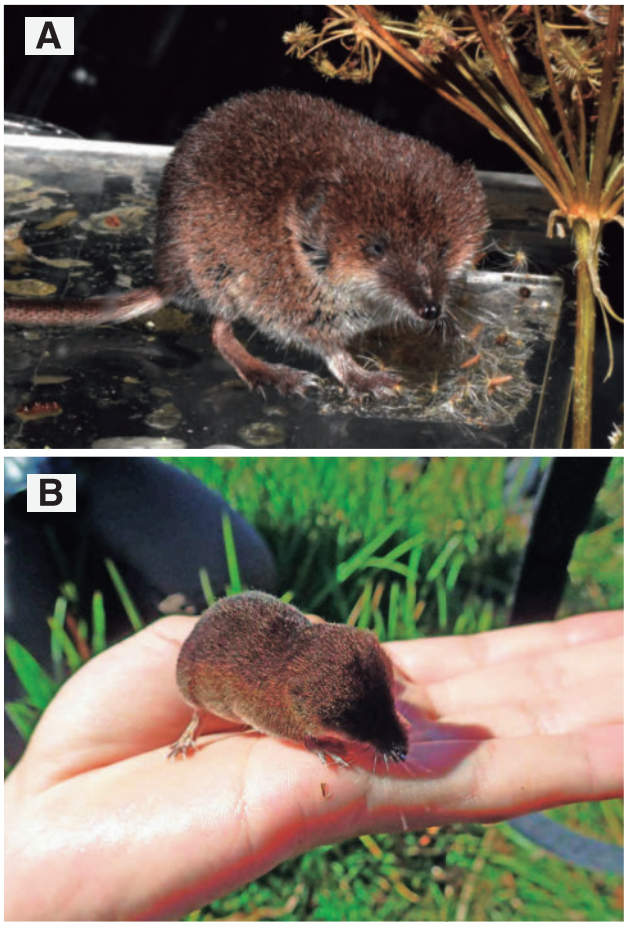


図 1：トガリネズミ類の外観．A：世界最小の哺乳類の一つのチビトガリネズミ *Sorex minutissimus*（2017 年 12 月，北大総合博物館のトガリネズミ展にて撮影）．B：デーネル現象がはじめて報告されたヨーロッパトガリネズミ *S. araneus*（2016 年 9 月ポーランドのビャウォヴィエジャ Białowieża にて撮影）．

結論はできないが，少なくとも肉眼で確認できるような典型的な冬眠や日内休眠はトガリネズミ類では観察されていない．このように北方系のトガリネズミ類と南方系のジネズミ類の形態は似ているが対照的な生理システムや生態学的特性を持つことが多い（Innes, 1994）．

日本には７種のトガリネズミ亜科と５種のジネズミ亜科の合計 12 種のトガリネズミ科動物が分布している（Ohdachi et al., 2015）．このうち，北海道にはオオアシトガリネズミ，バイカルトガリネズミ（北海道に生息するものは慣例的にエゾトガリネズミとよばれる），ヒメトガリネズミ，チビトガリネズミ（北海道に生息するものはトウキョウトガリネズミと呼ばれる事がある）４種のトガリネズミ類（トガリネズミ亜科）と南方にはニホンジネズミ（ジネズミ亜科）が生息している（大舘, 2021）．バイカルトガリネズミは本州，四国と佐渡に生息しているシントウトガリネズミ *Sorex shinto* と，チビトガリネズミは本州中部に生息しているアズミトガリネズミ *S.*

hosonoi と，それぞれ姉妹種の関係にある（Ohdachi et al., 2001; Ohdachi et al., 2006）．またオオアシトガリとヒメトガリは北海道・サハリン（樺太）～北東アジア大陸に分布している東アジア特産種である（Ohdachi et al., 2015）．一方，バイカルトガリは北海道・サハリン～ユーラシア大陸北部に分布する旧北区種（Palaearctic species），チビトガリは北海道・サハリン～ユーラシア大陸北部とアラスカ西部に分布する全北区種（Holarctic species）である（Ohdachi et al., 2015）．

次に北海道に生息する 4 種のトガリネズミの餌利用であるが，オオアシトガリはミミズを主要な餌として，この他にイモムシ，クモ，ザトウムシなどの節足動物などを食べている（Ohdachi, 1995b）．バイカルトガリはイモムシとクモ，ザトウムシ，ジムカデなどが主要な餌であるが，ミミズもわずかだが利用する（Ohdachi, 1995b）．ヒメトガリネズミはジムカデ，クモ，ザトウムシやイモムシなどを主な餌としている（Ohdachi, 1995b）．チビトガリもヒメトガリと同様に地表性の小型節足動物を主に食べている（Namba and Ohdachi, 2009）．また，活動空間については，オオアシトガリは半地下棲，他の 3 種は地表活動棲でありチビトガリはさらに草の上を利用することができる（Ohdachi, 1995a, 1997; Ohdachi et al., 2010；河原，2013）．

北海道のトガリネズミ類の越冬中の生態や生理については全くわかっていないが，ヨーロッパや北米の種ではいくつかの研究例はある（Aitchison, 1987; Churchfield, 2012）．トガリネズミ類の主な餌の土壌無脊椎動物の現存量は地表では少なくなるが，地中は温度がそれほど下がらないこともあり地中における餌の現存量は夏とはさほどかわらないことがヨーロッパの研究例で分かっている（Churchfield, 1982; Churchfield et al., 2012）．しかし，それでも，夏と比べて冬の餌条件は相対的に悪くなっていると考えられる．例えば，ヨーロッパトガリネズミの夏の重要な餌であるミミズは冬期には減るので，冬は嗜好性の高いあるいは好適な餌の不足が起こりうる（Churchfield et al., 2012）．この場合は他の小型節足動物などの利用可能な餌を補償的に食べているらしい．また次章のデーネル現象の説明で述べるがトガリネズミ類は冬期に体重を減らすので，餌の総摂取量を減らすことにより，餌不足を回避しているという説がある（Churchfield et al., 2012）．またトガリネズミ類は冬期には代謝率を下げたり，長く巣に籠もってじっとして餌量を下げるという説もある（Aitchison, 1987）．いずれにせよ，冬期，特に積雪量が多い場合には地中はさほど気温が下がらず，また土壌の小型節足動物のバイオマスは夏とあまり変わらないという餌条件は，トガリネズミ類が冬眠せずに越冬することを可能にしている．

北海道でも冬期に積雪が少ない苫小牧などの地域では，ミミズを主な餌とするオオアシトガリが比較的少ないことは（Ohdachi and Maekawa, 1990b），越冬中の餌の利用可能量と関係しているのかもしれない．北海道ではトガリネズミ類は自然状態の良いハビタットならどこにでも生息し，しかも 4 種も共存しているので，北海道はトガリネズミ類の越冬生態の研究を推し進めるには適した調査地域の一つである．著者はかつて冬期の生態に注目して調査を試みたことがあったが，積雪下での捕獲が困難で，調査を諦めた経験がある．しかし現在は著者らの研究グループではトガリネズミ類の飼育技術を確立したので実験室内で越冬生態や生理についての研究ができる状況になった．今後，トガリネズミ類の越冬に関する研究が進むことが期待されている．

ところで，サーモニュートラル・ゾーン（thermoneutral zone）より低い温度では，小型哺乳類の寒さ対策として震えによる発熱は効率的ではなく，褐色脂肪組織（brown adipose tissue）の代謝が最も重要であるとされている（Himms-Hagen, 1976）．トガリネズミ類は温帯北部～北極域に分布しているので，トガリネズミ類は冬期の間はサーモニュートラル・ゾーンよりも低い温度にさらされ続けていることになる．この事と関連していると思われるが，トガリネズミ類の脂肪組織は夏期でも冬期でもほとんどすべてが褐色脂肪組織（brown adipose tissue）からなっている（Hyvärinen, 1994）．北海道のトガリネズミにおいて褐色脂肪組織については，著者の知る限り調べられていないが，冬眠せずに厳冬期でも活動し続けるトガリネズミ類の褐色脂肪組織の動態の把握はトガリネズミ類の越冬生態を解明する上で今後の重要な研究課題となろう．

3. デーネル現象

ポーランドの A. デーネル August Dehnel（図 2）は，ヨーロッパトガリネズミ *Sorex araneus* で冬期に頭骨の高さが低くなることを報告した（Dehnel, 1949）．その後，トガリネズミ類では体サイズと頭骨サイズは厳冬期に減少し春に向かって急激に増大することがいくつも報告された（Yaskin, 1994; Lazaro et al., 2017; Lazaro et al., 2019）．例えば，ドイツ産のヨーロッパトガリでは脳頭蓋の高さが生まれた年の夏期よりも冬期に約 20% も縮んで，次の夏期にはもともとの大きさよりも 15% 大きくなることが報告されている（Lazaro et al., 2017）．この

図 2：デーネル博士の記念のレリーフと石碑（2016 年 9 月，ポーランドのビャウォヴィエジャにて撮影）．A：ポーランド科学アカデミー哺乳類学研究所の建物内のレリーフ．B：哺乳類学研究所に隣接する森林内でのデーネル博士を記念する石碑と筆者．

ように小型哺乳類が冬期に体サイズや頭骨サイズを減少させる現象は発見者にちなんでデーネル現象と呼ばれている（Lazaro and Dechmann, 2021）．

トガリネズミ科では北方系のトガリネズミ亜科でデーネル現象が報告されているが，南方系のジネズミ亜科では今のところ報告はない．何種かのネズミ類（齧歯目）でもデーネル現象は報告されている（Yaskin, 1984）．またヨーロッパでは，北方に生息しているヨーロッパモグラ *Talpa europaea*（真無盲腸目）でデーネル現象は見られるが，より南方に生息している近縁種のイベリアモグラ *T. occidentalis* では見られない（Novakova et al., 2022）．さらに北半球の冷涼地域に生息し 2 年以上の寿命を持っている小型イタチ科動物（食肉目）のオコジョやイイズナは，生まれた年の夏期よりも越冬中に体サイズや頭骨サイズが減少し，次の年の夏に最大値を示すことが報告されている（LaPoint et al., 2017）．このようにデーネル現象はトガリネズミ以外の北方系の小型哺乳類の何種かにおいて知られている．

では，なぜデーネル現象が起きるのかという究極的要因であるが，従来は冬期の餌資源量の減少と関連づけられて論議されることが多かった（Lazaro et al., 2017）．しかし，どうもそのような単純な理由ではないことが分かってきた．トガリネズミ類では資源量の不足により直接的にデーネル現象が引き起こされるのではないが，体サイズを減少させることによって必要な総エネルギー量を下げるためという説が挙げられている（Churchfield et al., 2012）．また基礎代謝率を下げて熱ロスを下げるために体サイズを減少させるという説もある（Taylor et al., 2013）．小型イタチ類やヨーロッパモグラではデーネル現象が餌資源の減少により引き起こされたわけではない，という研究結果もある（LaPoint et al., 2017; Novakova et al., 2022）．

結局，デーネル現象がなぜ起こるかという究極要因についての明確な回答はなく，現在，ヨーロッパの研究者を中心に研究されている状況である．さらにはこの現象がおこる生理的な至近要因についてもまったくわかっていない．北海道に生息するトガリネズミ類も具体的な分析データはないが冬期の頭蓋骨が小さいことは経験的にわかっている．ただし積雪が深い場所が多い北海道では冬期のサンプルが少ないので，今後，北海道のトガリネズミ類でもデータを収集してデーネル現象についての詳しい研究報告が望まれる．

4. まとめ

このように寒冷地域に生息するトガリネズミ類は餌不足が懸念される冬期にも冬眠せずに餌を求めて活動し続ける．しかも彼らは基礎代謝率が高く飢餓に非常に弱い．そして厳冬期には体サイズや頭骨サイズを減少させ春に向けて増大するという特異な生理的反応（デーネル現象）をする．しかし，なぜ彼らは体サイズや頭骨サイズを減少させるという“はなれ技”をしてまで，厳しい冬期にも高い活動を維持して冬を越すのであろうか？

ところでトガリネズミ類（トガリネズミ亜科）の多くの個体は春～秋に生まれて冬を越して春に繁殖を開始し，遅くとも次の冬の前に死亡するという生活サイクル

を持っている（茂原, 1985；Dokuchaev, 1989；大舘, 2011）．トガリネズミ類は原則的に春生まれだろうと秋産まれだろうと冬を越さないと繁殖を始めないが，メスのうち少数個体は生まれた年の冬前に繁殖を開始する．当年個体で繁殖を開始するメスの比率は北海道のような「南方」では数％（大舘，2011），東シベリアのような「北方」では数十％に達する（Dokuchaev, 2005）．これは冬を越すのがより厳しい地域では冬前に子供を生んでしまったほうが適応的であるということなのかもしれない．一方，オスでは冬を越す前に繁殖を開始する個体は稀である（Bellocq and Smith., 2003; Dokuchaev, 2005；大舘, 2011）．つまり多くのトガリネズミ類のオスはどの地域でも冬を越さないと繁殖を開始しない傾向にある．

一般に哺乳類では精子形成には高体温は不利であり，多くの哺乳類の成獣オスでは精巣は体腔から飛び出した睾丸という器官に収まり，精巣は体腔内の体温よりも低い温度が保たれている（Moore and Quick, 1924; Mäkelä et al., 2019）．一般に精巣が高温であると正常な精子形成が阻害される．しかしトガリネズミ類は基礎代謝が高く高体温にも関わらず，睾丸を持たずに生涯体腔内に精巣はとどまっている．つまりトガリネズミのオスの精巣は精子形成に不利な高体温に常にさらされていることになる．

一方，トガリネズミ科でも南方系のジネズミ亜科ではトガリネズミ亜科と異なりオス・メスともに生後数ヶ月以内に繁殖を開始するのが一般的である（織田，1985；Ohno et al., 1992）．ジネズミ亜科は一般にトガリネズミ亜科よりも体温が低いので（Churchfield, 1990; Taylor, 1998），睾丸がなくとも精子形成も問題がないのかもしれない．一方，トガリネズミ亜科では代謝率が高くなる方向に進化し，高体温は系統的制約であり，この制約下でトガリネズミ類は効果的に精子形成を行わねばならないと思われる．そこで著者は，トガリネズミ類のオスが冬を越さないと繁殖を始めないのは，体腔内の精巣が接する体表面の温度を下げて精子形成を正常に行うために低温暴露が必要なためである，という仮説を立てた．現在，このことを検証するためにトガリネズミ類の繁殖生理について，鳥取大学（元東海大）の佐藤陽子博士らと共同研究を進めている．もしこの仮設が正しければ，トガリネズミ類のほとんどが寒冷地域に分布していることを繁殖生態との関連で説明できるかもしれない．また前章で説明した厳冬期に体サイズを減少させること（デーネル現象）と繁殖との関連についても興味深いことである．

北海道にはこの興味深い生態と生理を有しているトガリネズミ科動物が５種（トガリネズミ亜科は４種）も生息しているのでトガリネズミ類の生態や生理の研究を行うのに適している．そして現在，飼育技術も向上し飼育下での繁殖も試みられている．今後，トガリネズミの研究を総合的に進めるために広い分野の研究者が増えてくれることを心から望む．

謝辞

中田圭亮，岩佐真宏，坪田敏男，河合久仁子，崎山智樹の各氏には北海道の哺乳類の冬眠や越冬生態に関する情報を教えていただいた．山口良文氏には初期の原稿に対して批評を加えていただいた．以上の方々に御礼申し上げる．

引用文献

阿部永．（1985）．適応放散からみた現生トガリネズミ類の分類，分布，生態．In 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵（編集），スンクス．実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学（pp.20–37）．東京：学会出版センター．

阿部永（監修）．（2005）．日本の哺乳類．改訂版．東京：東海大学出版会．

Aitchison, C. W. (1987). Winter energy requirements of soricine shrews. *Mammal Review, 17*, 25–38.

Bellocq, M. I. and Smith, S. M. (2003). Population dynamics and foraging of *Sorex cinereus* (masked shrew) in the boreal forest of eastern Canada. *Annales Zoologici Fennici, 40*, 27–34.

Burgin, C. J., Wilson, D. E., Mittermeier, R. A., Rylands, A. B., Lacher, Thomas E., and Sechrest, W. (2020). *Illustrated Checklist of the Mammals of the World*: Lynx Editions.

Churchfield, S. (1982). Food availability and the diet of the common shrew, *Sorex araneus*, in Britain. *Journal of Animal Ecology, 51*, 15–28.

Churchfield, S. (1990). *The Natural History of Shrews* (1st ed.). London: A & C Black Ltd.

Churchfield, S., Rychlik, L., and Taylor, J. R. E. (2012). Food resources and foraging habits of the common shrew, *Sorex araneus:* does winter food shortage explain Dehnel's phenomenon? *Oikos, 121*, 1593–1602.

Dehnel, A. (1949). Studies on the genus *Sorex* L. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, sectio C, 4*, 17–102.

Dokuchaev, N. E. (1989). Population ecology of *Sorex* shrews in North-East Siberia. *Annales Zoologici Fennici, 26*, 371–380.

Dokuchaev, N. E. (2005). Reproduction of shrews (*Sorex*) in Siberia. In J. F. Merritt, S. Churchfield, R. Hutterer, & B. I. Sheftel (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews II. Special Publication of the International Society of Shrew Biologists*.

(pp. 425–434). New York: International Society of Shrew Biologists.

Dubey, S., Salamin, N., Ohdachi, S. D., Barrière, P., and Vogel, P. (2007). Molecular phylogenetics of Soricidae (Mammalia, Soricidae) reveals timing of transcontinental colonisations. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 44*, 126–137.

French, A. R. (2000). Interdependency of stored food and changes in body temperature during hibernation of the Eastern Chipmunk, *Tamias striatus*. *Journal of Mammalogy*, 81: 979–985.

船越公威.（2020）. コウモリ学：適応と進化. 東京：東京大学出版会.

長谷川政美.（2014）. 系統樹をさかのぼって見えてくる進化の歴史：ベレ出版.

長谷川政美.（2020）. 分子情報にもとづいた真獣類の系統と進化. 哺乳類科学, *60*, 269–278.

林田光祐.（1988）. エゾリスの社会行動が分散貯蔵の様式に与える影響. 北海道大學農學部演習林研究報告, *45*, 267–278.

Himms-Hagen, J. (1976). Cellular thermogenesis. *Annual Review of Physiology, 38*, 315–351.

Hyvärinen, H. (1994). Brown fat and the wintering of shrews. In J. F. Merritt, G. L. Kirkland, Jr., & R. K. Rose (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews* (pp.259–266). Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.

Innes, D. G. L. (1994). Life histories of the Soricidae. In J. F. Merritt, G. L. Kirkland, Jr., & R. K. Rose (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews* (pp.111–136). Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.

河原淳.（2013）. チビトガリネズミ *Sorex minutissimus* の生態学的研究. 博士学位論文. 酪農学園大学, 江別市.

川道美枝子.（2000）. シマリス. In 川道武男・近藤宣昭・森田哲夫（編集）, 冬眠する哺乳類（pp.143–161）. 東京：東京大学出版会.

Kawamichi, T. (1971). Annual cycle of behaviour and social pattern of the Japanese pika, *Ochotona hyperborea yesoensis*. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. Zoology and Ecology, 18*, 173–185.

川道武男.（1994）. ウサギがはねてきた道. 東京：紀伊國屋書店.

川道武男.（2000）. 冬眠の生態学. In 川道武男・近藤宣昭・森田哲夫（編集）, 冬眠する哺乳類（pp.31–99）. 東京：東京大学出版会.

LaPoint, S., Keicher, L., Wikelski, M., Zub, K., and Dechmann, D. K. (2017). Growth overshoot and seasonal size changes in the skulls of two weasel species. *Royal Society Open Science, 4*, 160947. doi:10.1098/rsos.160947

Lazaro, J. and Dechmann, D. K. N. (2021). Dehnel's phenomenon. *Current Biology, 31*, R463-R465. doi: 10.1016/j. cub. 2021.04.006

Lazaro, J., Dechmann, D. K. N., LaPoint, S., Wikelski, M., and Hertel, M. (2017). Profound reversible seasonal changes of individual skull size in a mammal. *Current Biology, 27*, R1106-R1107. doi:10.1016/j.cub.2017.08.055

Lazaro, J., Hertel, M., Muturi, M., & Dechmann, D. K. N. (2019). Seasonal reversible size changes in the braincase and mass of common shrews are flexibly modified by environmental conditions. *Scientific Reports, 9*, 2489. doi:10.1038/s41598-019-38884-1

Lyman, C. P. (1982). Who is who among the hibernators. In C. P. Lyman, J. S. Willis, A. Malan, & L. C. H. Wang (Eds.), *Hibernation and Torpor in Mammals and Birds* (pp.12–36). New York: Academic Press.

Mäkelä, J. A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E., and Toppari, J. (2019). Testis development. *Endocrine Reviews, 40*, 857–905.

Merritt, J. F. (2010). *The Biology of Small Mammals*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Moore, C. R. and Quick, W. J. (1924). The scrotum as a temperature regulator for the testis. *American Journal of Physiology, 68*, 70–79.

森田哲夫.（2000）. アカネズミと日内休眠. In 川道武男・近藤宣昭・森田哲夫（編集）, 冬眠する哺乳類（pp.234–246）. 東京：東京大学出版会.

中田圭亮.（2021）. 北海道の野ネズミたち. モーリー（北海道ネーチャーマガジン）, *57*, 18–21.

Namba, T. and Ohdachi, S. D. (2009). Diets of the Eurasian least shrew (*Sorex minutissimus*) from various localities in Hokkaido, Japan. *Mammal Study, 34*, 219–221.

Neves, T., Tapisso, J. T., Porto, M., Pereira, H. M., Mathias, M. L., and Borda-de-Água, L. (2018). The role of competition in driving species global distributions: Soricid shrews as a case study. *Journal of Biogeography*, 1–11. doi:10.1111/jbi.13463

Novakova, L., Lazaro, J., Muturi, M., Dullin, C., and Dechmann, D. K. N. (2022). Winter conditions, not resource availability alone, may drive reversible seasonal skull size changes in moles. *R Soc Open Sci, 9*, 220652. doi:10.1098/rsos.220652

織田銑一.（1985）. 飼養管理と繁殖方法. In 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵（編集）, スンクス *Suncus murinus*. 実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学（pp.102–111）. 東京：学会出版センター.

Ohdachi, S. (1995a). Burrowing habits and earthworm preferences of three species of *Sorex* in Hokkaido. *Journal of the Mammalogical Society of Japan, 20*, 85–88.

Ohdachi, S. (1995b). Diets and abundances of three sympatric shrew species in northern Hokkaido. *Journal of the Mammalogical Society of Japan, 20*, 69–83.

Ohdachi, S. (1997). Laboratory experiments on spatial use and aggression in three sympatric species of shrew in Hokkaido, Japan. *Mammal Study, 22*, 11–26.

大舘智志.（2011）. トガリネズミ科動物の生態と多様性 In 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵（編集）, スンクスの生物学（pp.34–48）. 東京：学会出版センター.

大舘智志.（2021）. 北海道の小さな猛獣トガリネズミ. モーリー（北海道ネーチャーマガジン）, *57*, 24–27.

Ohdachi, S., Dokuchaev, N. E., Hasegawa, M., and Masuda, R. (2001). Intraspecific phylogeny and geographic variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* species based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Molecular Ecology, 10*, 2199–2213.

Ohdachi, S. D., Hasegawa, M., Iwasa, M. A., Abe, H., Vogel, P., Oshida, T., and Lin, L. K. (2006). Molecular phylogenetics of soricid shrews (Mammalia) based on mitochondrial cytochrome b gene sequences: with special reference to the Soricinae. *Journal of Zoology, London, 270*, 177–191.

Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., Fukui, D., and Saitoh, T. (Eds.) (2015). *The Wild Mammals of Japan. 2nd edition*. Kyoto: Shoukadoh.

Ohdachi, S. D. and Kawahara, A. (2015). *Sorex minutissimus* Zimmermann, 1780. In S. D. Ohdachi, Y. Ishibashi, M. A. Iwasa, Fukui, D, and T. Saitoh (Eds.), *The Wild Mammals of Japan. 2nd edition* (pp.2–3). Kyoto: Shoukadoh.

Ohdachi, S. and Maekawa, K. (1990a). Relative age, body weight, and reproductive condition in three species of *Sorex* (Soricidae; Mammalia) in Hokkaido. *The Research Bulletins of the College Experiment Forests, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 47*, 535–546.

Ohdachi, S. and Maekawa, K. (1990b). Geographic distribution and relative abundance of four species of soricine shrews in Hokkaido, Japan. *Acta Theriologica, 35*, 261–267.

Ohno, K., Niwa, Y., Kato, S., Koyasu, K., Oda, S., and Kondo, K. (1992). The domestication of *Crocidura dsinezimi* as a new laboratory animal. *Experimental Animals (Tokyo), 41*, 449–454.

茂原信生．（1985）．哺乳動物の成長．トガリネズミ類における特徴．In 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵（編集），スンクス *Suncus murinus*．実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学（pp.68–76）．東京：学会出版センター．

Taylor, J. R. E. (1998). Evolution of energetic stragegies in shrews. In J. M. Wójcik & M. Wolsan (Eds.), *Evolution of Shrews* (pp. 309–346). Białowieża: Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences.

Taylor, J. R., Rychlik, L., and Churchfield, S. (2013). Winter reduction in body mass in a very small, nonhibernating mammal: consequences for heat loss and metabolic rates. *Physiological and Biochemical Zoology, 86*, 9–18.

坪田敏男．（2000）．クマ―生理的側面から―．In 川道武男・近藤宣昭・森田哲夫（編集），冬眠する哺乳類（pp.213–233）．東京：東京大学出版会．

坪田敏男．（2011）．クマの生物学―クマという生きもの．In 坪田敏男・山﨑晃司（編集），日本のクマ．ヒグマとツキノワグマの生物学（pp.1–36）．東京：東京大学出版会．

Yaskin, V. A. (1984). Seasonal changes in brain morphology in small mammals. In J. F. Merritt (Ed.), *Winter Ecology of Small Mammals* (pp.183–191). Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.

Yaskin, V. A. (1994). Variation in brain morphology of the common shrew. In J. F. Merritt, G. L. Kirkland, Jr., & R. K. Rose (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews* (pp.155–162). Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.

低温科学 81 （2023） 89–97
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 89

コウモリの越冬生態
―冬のエネルギー配分に関わる多様な行動特性と気候変動の影響について―

佐藤　雄大[1)]

2022 年 12 月 22 日受付，2023 年 1 月 16 日受理

調査手法や解析技術の発達により，コウモリの野外個体群を対象とした生態研究が幅広く行われ，哺乳類の中でも特異な進化をとげた生活史戦略の一端が解明されてきた．このうち越冬生態については，種による違いだけでなく，同種の個体群間や個体間でもバリエーションがみられている．最近では，冬眠の利益とコストというトレードオフの観点に基づく最適理論が導入され，野外で観察される体温調節行動や越冬場所利用のパターンが，どのように決定されるのかについても明らかとなってきた．こうした知見は，気候変動によってコウモリの冬眠および繁殖フェノロジーに生じる影響を予測・評価する上でも有用な情報となることが期待されている．

Hibernation ecology of bats
― brief review in terms of wintering energy considerations and climate change effects ―

Takahiro Sato[1]

Recent advances in research methods and analytical techniques have enabled us to study a variety of ecological and behavioral aspects of bats in the field. Various studies have showed that the hibernation ecology of bats varies among species, among populations, and even among individuals in a population. Furthermore, the optimal hibernation theory, which takes into account the trade-offs between costs and benefits of hibernation, has been explained how torpor expression and hibernation site use are determined. Here, we briefly review the new aspects of hibernation ecology of bats, and also discuss about the influences of climate change on the phenology of hibernation and reproduction.

キーワード：越冬生態，トレードオフ，繁殖戦略，気候変動，コウモリ目
Hibernation ecology, Trade-offs, Reproductive strategies, Climate change, Chiroptera

1．はじめに

季節変化の大きな環境下では，気象条件とともに，食物の利用可能性も時空間的に大きく変動する．特に冬期は，多くの動物が厳しい低温環境と餌不足に直面する．哺乳類や鳥類のような恒温動物は，高い体温を維持する仕組みを獲得したことで幅広い環境条件のもとで活動を可能にしたが，その体温を安定して維持し続けるには多くのエネルギーが必要である（Grigg et al., 2004）．体サイズの小さな種では，体表面積あたりの熱損失率が高い

連絡先
佐藤　雄大
徳島大学大学院社会産業理工学研究部
〒770–8506　徳島県徳島市南常三島町 2–1
Tel. 088–656–9132
e-mail：satoj@tokushima-u.ac.jp

1）徳島大学大学院社会産業理工学研究部
〒770–8506　徳島県徳島市南常三島町 2–1
Graduate School of Technology, Industrial, and Social Sciences, Tokushima University, 2–1 Minamijosanjima-cho, Tokushima 770–8506, Japan

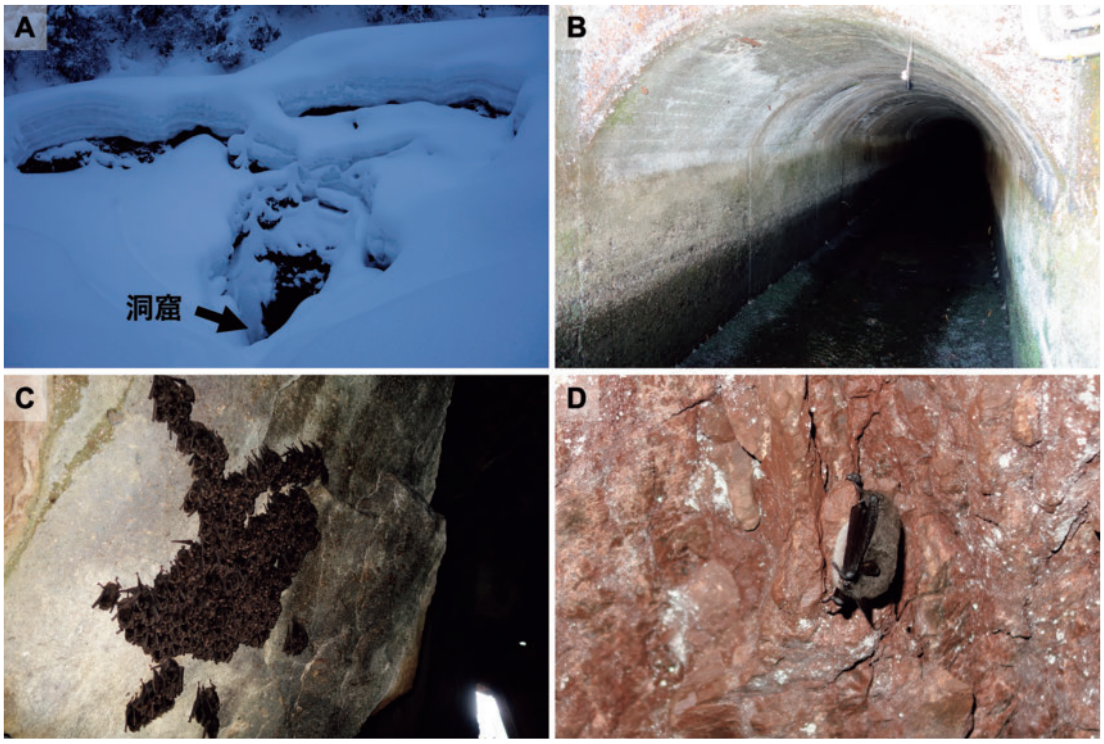


図 1：コウモリの冬眠．写真はそれぞれ，積雪地域における越冬ねぐら周辺の環境（A），コウモリが冬眠するトンネル内部の様子（B），群れを形成して冬眠するユビナガコウモリ（C），単独で冬眠するモモジロコウモリ（D）を示す．

ため，外気温の低い環境下では体温維持のコストが極めて大きい（同サイズの外温動物の 30–100 倍）（Nagy et al., 1999; Speakman and Thomas, 2003）．そのため，多くの種が，環境条件の季節的変化に対応した生活史戦略を獲得している．鳥類では，より温暖な地域へ渡りをする種が多くみられるが，哺乳類では体温・代謝率を能動的に調節する休眠によって，エネルギー消費を最小限に抑え，厳しい環境条件をやり過ごすことができる（Ruf and Geiser, 2015）．冬の間，長期間にわたって低体温・低代謝状態となる冬眠は，寒冷地に適応した小型哺乳類を特徴づける生存戦略といえるだろう（Geiser, 2013）．

コウモリは，齧歯類に次ぐ種多様性を有し（1,000–1,200 種，哺乳類全体の約 20%），他の哺乳類にはない特異な進化を遂げた分類群である（Altringham, 2011）．その大きな特徴として，コウモリは哺乳類の中で唯一，翼によって自力飛翔できることが挙げられる．その高い移動能力により，コウモリは極地を除く全大陸に分布しており，亜寒帯から熱帯にかけて幅広い気候帯に生息する（Altringham, 2011）．食性も多様で，昆虫食を中心に，果実・花蜜食から肉食（小鳥や魚，小型脊椎動物など），血液食まで存在する（Kunz et al., 2011）．これらの餌資源を獲得するため，小型コウモリではエコーロケーション（反響定位）による高度な空間認識能が発達しており，そのことが多様なニッチへの適応放散を可能にしたと考えられている（Jones and Teeling, 2006）．一方，コウモリにとって，飛翔や，飛翔中のエコーロケーションは著しいエネルギー消費を伴う行動でもある（Neuweiler, 2000; Shen et al., 2010）．コウモリは高い飛翔能力を獲得した反面，表面積の大きな翼の存在により，外気に熱を奪われやすい（Speakman and Thomas, 2003）．気温低下や餌量の減少は，他の小型哺乳類と同様，コウモリにとっても極めて過酷な状況となる．それゆえ，亜寒帯から亜熱帯までを含む幅広い環境下において，多くのコウモリが冬眠する（Webb et al., 1996; Stawski et al., 2014）．

冬眠するコウモリ（図 1）は，越冬に必要なエネルギー源のほぼすべてを，冬眠開始までに蓄えた脂肪に依存する．寒さが厳しく餌資源も枯渇する条件下では，できるだけ長く低体温・低代謝状態を維持することで脂肪消費を最小限に抑え，生存と翌シーズンの繁殖のためにエネルギーを節約することができる．しかし，他の冬眠する哺乳類と同様，すべての冬眠するコウモリが，蓄積脂肪の著しい消費を伴う中途覚醒（Thomas et al., 1990）によって休眠を中断する．長期間におよぶ低体温・低代謝は，体内における代謝老廃物の蓄積や免疫機能の低下，さらには捕食圧や凍結リスクの増大につながるとされている（Humphries et al., 2003; Stawski et al., 2014）．それ

ゆえ，中途覚醒には，冬眠に伴うそのような生理・生態的コストを低減する役割があると考えられてきた（Humphries et al., 2003）．Boyles et al（2020）によると，冬眠中におけるコウモリの体温調節は，低体温・低代謝によってエネルギー消費を抑えられる利益と，冬眠に伴う生理・生態的コストとのトレードオフに基づいて決定されると指摘している（“optimal hibernation theory”）．最近ではこのようなトレードオフの観点に基づき，多くの研究が，休眠の発現（ここでは個体が低体温・低代謝状態となることを指す）や越冬場所選択に対する様々な要因の効果を検証している（栄養状態，物理環境，餌資源，感染症など）．それらの研究には，バイオロギング技術や，動画撮影装置，解析ツールの急速な発展により（例えば，Hayman et al., 2017; Keicher et al., 2022; Meier et al., 2022），野外個体群にも適用可能な手法が増えたことが大きく貢献している．こうした技術発展も相まって，コウモリの越冬生態には，単一個体群内の個体レベルから，個体群間，あるいは種間で様々なバリエーションがみられることがわかってきた（Stawski et al., 2014; Willis, 2017; Boyles et al., 2020）．

こうした近年の研究動向を踏まえ，本稿は，（1）コウモリの越冬生態に注目し，個体，個体群間，種間の各階層でみられる特徴について，比較的新しい研究事例を交えて解説するとともに，（2）コウモリに特有の，冬眠と繁殖機会の関係性についても考察した上で，（3）近年顕在化しつつある気候変動が，コウモリの冬眠や繁殖のフェノロジーに及ぼし得る影響について，今後の課題も踏まえながら紹介したい．

2. 越冬生態の特徴

2.1. 個体レベル　―越冬場所選択―

個体内では，栄養状態の継時的変化によって，休眠に入る長さや冬眠場所の選択性も変わってくると考えられる．越冬期間の後半になるほど，また，撹乱などで覚醒頻度が増加するほど蓄積脂肪は少なくなり，飢餓のリスクが大きくなる（Altringham, 2011）．そのような状況に直面すると，個体は脂肪消費を少なく抑えられるよう，より低温な場所を選択し，長くて深い休眠に入ることが室内実験によって明らかとなっている（Boyles et al., 2007; Wojciechowski et al., 2007）．冬眠場所の選択に関する類似の現象は野外個体群でも観察されており，その最たる例は，アメリカ東部を中心に洞窟棲コウモリの大量死を引き起こした white-nose syndrome（WNS）の感染拡大によるものである．この感染症は好冷真菌の１種（*Pseudogymnoascus destructans*）によるもので，感染したコウモリは冬眠中に中途覚醒を頻発した後，衰弱死してしまう（Reeder et al., 2012; Warnecke et al., 2012）．感染影響を調べた研究によると，WNS 到来以前には，ねぐら内の比較的温暖な場所で冬眠していたコウモリが，WNS 到来以降には，同じねぐらのより寒冷な場所で冬眠するようになっていた（Loeb and Winters, 2022）．WNS の原因菌は 10℃を下回る低温下では増殖しにくいため（Blehert et al., 2009; Verant et al., 2012），より寒冷な場所で冬眠した個体は感染による影響の顕在化を免れ，生き延びることができたと推察される．

コウモリの利用するねぐら（洞窟，樹洞，トンネル，家屋，橋梁など）は，その構造や立地によって，内部に様々な微気候（温度，湿度，大気圧，通気性など）を形成する．上述の WNS 感染による影響からもわかるように，どのような微気候を選択するかは，冬眠期を生き延びる上で重要な意味をもつ．従来は，種レベルで冬眠にもっとも適した温度範囲が存在し，個体はそのような条件の場所をねぐらとして利用すると考えられてきた（Day and Tomasi, 2014）．しかし，長期間におよぶ越冬場所利用に関する研究から，最近では，必ずしも種内のあらゆる個体が一定の温度条件を選ぶわけではないことも指摘されている（Boyles et al., 2017; De Bruyn et al., 2021）．例えば，ホオヒゲコウモリ属の１種である *Myotis sodalis* の野外個体群では，同じ洞窟内であっても，室内実験から推定される最適温度（エネルギー消費が最小となる温度帯：3–6℃，Day and Tomasi, 2014）よりも幅広い温度条件で冬眠することがわかっている（Boyles et al., 2017）．このことは，これまで想定されていた以上に，個体間でエネルギー事情にばらつきがあり，ねぐら内部の微気候を幅広く使い分けている可能性を示唆している．

2.2. 個体レベル　―雌雄差―

冬眠中，エネルギー節約をどの程度優先するかは，個体の栄養状態だけでなく，性別によっても異なる．特に雌雄差については，興味深いことにコウモリ特有の繁殖戦略が関係している．温帯域に生息し，冬眠するコウモリの多くは受精遅延と呼ばれる特徴的な繁殖周期をもつ（Racey, 1979; Racey and Entwistle, 2000）．この繁殖周期のもとでは，繁殖へのエネルギー投資のタイミングに顕著な雌雄差が存在する（Willis, 2017）（図 2）．オスでは夏から秋にかけて，精子形成や交尾相手獲得のためにエネルギー投資が最大となる．一方，メスのエネルギー投資は，胎児の成長とそれに続く子の哺育のため，春か

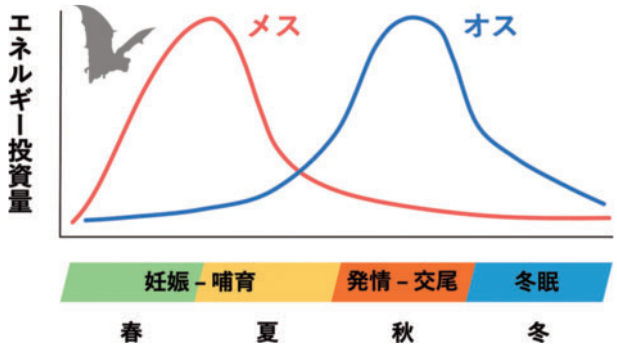


図 2：雌雄による繁殖へのエネルギー投資時期の違い．

ら夏にかけてピークとなる．この場合，メスの方が，冬眠中のエネルギー消費を低く抑え，良好な栄養状態を維持して春以降の繁殖に備える必要性が高いといえる．北米内陸部に生息するトビイロホオヒゲコウモリ（*Myotis lucifugus*）の野外個体群を対象とした研究によると，メスは，冬眠に入る時点でオスよりも脂肪を多く蓄積し，その消費ペースも緩やかである（Jonasson and Willis, 2011）．同様に，冬眠中の体温調節パターンにも雌雄差がみられる．個体の体温変化を追跡すると，中途覚醒時の活動時間は，メスの方がオスよりも 22% 短い（Czenze et al., 2017）．また，中途覚醒中のオスの表面体温は 30℃以上で安定するのに対し，メスの表面体温は恒温状態に達した後，覚醒の合間に一時的な低下（25℃前後）もみられる（“heterothermic arousals”, Jonasson and Willis, 2012; Czenze et al., 2017）．これらの結果から，メスは中途覚醒に係るエネルギー消費を節約することで，コンディションを維持している可能性が示唆される（“thrifty female hypothesis”, Jonasson and Willis, 2011）．越冬中におけるエネルギー消費率の雌雄差は，冬眠明けのタイミングにも影響している．冬眠明けの時期は，メスの方がオスより早く，また，メスの中でもコンディションの良い個体ほど早い傾向がみられる（Norquay and Willis, 2014; Czenze and Willis, 2015）．

2.3. 個体群レベル

同種の個体群間でも，越冬生態は緯度勾配に沿って異なる可能性が指摘されている（Boyles et al., 2020）．高緯度地域ほど冬が長く，気温も低いため（例，図 1A），採餌する機会はなく（Czenze et al., 2013），飢餓に陥るリスクも高い．それゆえ，高緯度地域に生息する個体群ほど，冬眠前に蓄えた脂肪をできるだけ消費しないよう，中途覚醒頻度を少なく抑えなければならないだろう．冬の低温が厳しいカナダ内陸部（北緯 53 度）で越冬する個体群では，冬眠期間が 8ヶ月間にもおよび，個体は最長で 60 日以上も中途覚醒せずに低体温（表面体温で 10℃前後）になることが知られている（Norquay and Willis, 2014; Czenze et al., 2017b）．このような地域では，冬眠中，中途覚醒のタイミングが特定の時間帯に集中しないという特徴もある（活動期には日没後 2–3 時間に活動量が集中）（Czenze et al., 2013）．一方，低緯度地域では冬が短く，外気温も比較的温暖になりやすい．この場合，外気温の上昇に伴って昆虫類が活動的になるため（Taylor, 1963），コウモリが採餌できる機会も増加する．実際に，冬期気候が比較的温暖な地域（概ね最低気温 0℃以上）では，ねぐらを出て採餌することが確認されている（Whitaker et al., 1997; Bernard et al., 2021）．緯度勾配に沿って同種内の体温調節行動を比較した研究は少ないものの，冬の外気温が 10℃以上になることもある地域では，概して冬眠期間が短く，休眠の最大持続日数も 10–20 日間と短い傾向にある（Park et al., 2000; Hope and Jones, 2012; Czenze et al., 2017a）．また，高緯度地域とは対照的に，中途覚醒のタイミングは日没前後の時間帯に集中する（Park et al., 2000; Hope and Jones, 2012）．外環境の影響をほとんど受けない洞窟内部でも，個体の覚醒タイミングに概日リズムがみられることは興味深い特徴の一つといえる．こうした特徴は，餌昆虫の出現する時間帯に活動時間を合わせることで，採餌できる機会を最大限に利用するためのものと考えられている．温帯域に生息するコウモリと同様，熱帯から亜熱帯に生息する種でも，冬期における休眠の持続日数は，低緯度地域の個体群の方が短いことも報告されている（Stawski, 2012）．採餌によって越冬に必要なエネルギーを補填できる場合，低緯度地域の個体群ほど，長期間にわたって低体温を維持する必要性は低いのだろう（冬眠時の生理・生態的コストの回避）．

冬眠研究で注目されることの多い休眠時代謝率は，その最小値や温度変化に対する反応も含め，互いに 1,000 km 以上離れた個体群間でもほとんど違いがみられない（McGuire et al., 2022）．飛翔能力のあるコウモリでは，越冬に適した環境条件を備える場所間（ねぐら内・ねぐら間の両方）を移動することができるため（Kim et al., 2019; De Bruyn et al., 2021），生理的性質に地域差が生じにくいのかもしれない．

2.4. 種間レベル

同じ環境条件のもとでも，越冬生態に種間差がみられることもある．これには，群れの形成や採餌生態といった行動特性が関係していると考えられる．冬眠中に体を密に寄せ合う群れ形成（例，図 1C）は，洞窟で冬眠する

コウモリによくみられる特徴であり，数十頭から，時に数千頭を超える大規模なものになる．こうした群れ形成は，単独でいる時よりも熱損失や水分損失を低く抑える効果があるとされている（Boyles et al., 2008; Boratynski et al., 2012, 2015）．群れで冬眠する種について個体の体温変化を調べた研究によると，中途覚醒のタイミングは個体間で同調性を示し，越冬後期には日没前後の時間帯にも同調することが明らかとなっている（Czenze et al., 2013; Czenze and Willis, 2015）．このような同調性は，産熱効率を高め，体温上昇に伴うエネルギーコストを低減している可能性を示唆するものである（Boyles et al., 2008）．こうしたエネルギー節約のメリットは，体表面積あたりの熱損失率が高い，体サイズの小さな種ほど大きいと考えられる．また，冬眠時の群れサイズは種によって大きく異なり，日によって気温が変動しやすい場所ほど小さくなる傾向もある（Boyles et al., 2008）．例えば，気温変化の影響を受けやすい場所（落葉下や樹洞，建物など）で冬眠する種は，その多くが単独から数頭の群れでみられる（Boyles and Robbins, 2006; Mormann and Robbins, 2007）．一方，大規模な群れで冬眠する種は，そのほとんどが内部環境の安定した洞窟等で確認される．ただし，このような違いについては，体温調節だけでなく，越冬場所として利用可能な空間スペースの大きさも関係しているのだろう．

採餌生態にみられる種間差も，越冬戦略に影響する要因の一つである．同所的に生息するコウモリ間でも，形態的特性やエコーロケーションの種類によって，採餌環境や捕食方法，餌の種類，サイズに違いがある（Siemers and Schnitzler, 2004）．それゆえ，同じ越冬環境のもとでは，それぞれの種の採餌生態（特に餌の種類と捕食方法）によって，餌を得られる可能性が異なるだろう．採餌できる機会が頻繁にある場合，エネルギー節約のために休眠利用を優先する必要性は，それほど高くないかもしれない．直接的に種間の体温調節行動を比較したものではないが，興味深い例として，ドイツ西部で越冬するホオヒゲコウモリ属２種（ノレンコウモリ　*Myotis nattereri* とドーベントンコウモリ　*M. daubentonii*）を対象とした研究が挙げられる．この２種は，体重が同程度で，同じねぐらで冬眠する．個体識別タグを利用した７シーズンに及ぶ調査の結果，ノレンコウモリの方がドーベントンコウモリよりも２ヶ月ほど遅れて冬眠に入ることが明らかとなった（Meier et al., 2022）．前者は，地表面からの拾い食いが可能で（Swift and Racey, 2002），冬の間，動かない昆虫も捕食することができる．一方，後者は水辺で採餌し，発生時期に季節性のある飛翔性昆虫（水生昆虫の成虫）を好む傾向がある（Jones and Rayner, 1988）．このような採餌生態にみられる種間差は，晩秋から初冬にかけての活動頻度に違いを生じさせ，冬眠開始時期にも影響しているのだろう．

3. 冬眠による機会喪失

あらゆる行動戦略と同様，個体が冬眠に入ることは，必然的に他の行動をとる機会が失われることも意味する．冬眠するコウモリにとって，長期間の休眠状態に入ることで喪失する重要な機会の一つは，交尾であると考えられる（Boyles et al., 2020）．いくつかの種では，冬の間，オスが精巣上体尾部に精子を貯蔵し（Racey and Entwistle, 2000），冬眠中のメスに交尾することが知られている（Thomas et al., 1979; Boyles et al., 2006）（図 3）．このような行動をとるオスにとって，休眠する頻度が高くなるほど，交尾できる機会を逸してしまうリスクも大きくなる．特に受精遅延する種は，交尾から受精までの長いタイムラグと少ない産子数という特徴をもつため，より多くの交尾機会獲得が，受精成功を左右すると考えられている（Orr and Zuk, 2013; Fasel et al., 2019）．このことから，オスの越冬生態については，少なからず性選択による影響を受けている可能性がある．既存研究でも，オスは，メスに比べて冬眠入りの時期が遅いこと（Norquay and Willis, 2014; Meier et al., 2022），中途覚醒中の活動時間が長い（Czenze et al., 2017b）ことを踏まえ，交尾機会獲得との関係性を考察している（Norquay and Willis, 2014; Willis, 2017）．ただし，高緯度地域に生息する種では，冬の間に採餌する機会がほとんどないため，交尾にエネルギーを投資した場合，蓄積脂肪を消費し切ってしまうリスクも大きい．交尾機会の獲得については，採餌によってエネルギーを補填できる場合（冬期気候が温暖な地域など）でのみ重要度が高いという可能性もある．

4. 気候変動の影響

近年，急速に進行する気候変動に伴い，冬眠する哺乳類を取り巻く環境変化と個体群に対する影響の顕在化が懸念されている（Wells et al., 2022）．既に，高緯度地域や高標高帯では，気温上昇に伴って植物の成長時期にずれが生じており（Prevey et al., 2017），同時に昆虫類の発生時期にも影響がみられつつある（Forrest, 2016; Harvey et al., 2020）．このような変化は，コウモリのフェノロジーにも影響を及ぼし得る（Linton and

図 3：冬眠期に観察される強制交尾．写真は日本に広く生息するコキクガシラコウモリ．

Macdonald, 2018）．例えば，冬の気温上昇は，休眠に入る長さや頻度を変化させ，越冬成功率を左右するかもしれない（Wells et al., 2022）．また，餌となる昆虫類のフェノロジー変化は，春以降，コウモリの繁殖シーズンにおける餌の利用可能性を左右する可能性もある（Meyer et al., 2016）．コウモリは概して妊娠期間が長く，出産はごく短期間に集中する（Barclay and Harder, 2005）．それゆえ，昆虫の発生ピークがずれると，母子がもっともエネルギーを必要とする時期に，餌不足に陥るかもしれない．これまで，気候変動がコウモリに与える影響については，分布や多様性の変化に注目した研究が大半を占めており，冬眠や繁殖周期との関係を調べた研究はまだ少ない（Festa et al., 2022; Meier et al., 2022）．このことは，Wells et al（2022）が指摘するように，依然として生活史イベント（冬眠，繁殖，渡りのタイミングなど）に関する知見が，種や地域によって偏っていることも影響しているのだろう．特に，日本を含むアジア圏では，生息する種の多様性に反して，気候変動の影響に関する知見は極めて限られている（Festa et al., 2022 によるシステマティックレビューで，日本はゼロ）．

冬眠するコウモリは，同サイズの冬眠しない哺乳類よりも少ない産子数，遅い性成熟，長い世代時間といった，slow life 型の生活史戦略を獲得している（Turbil et al., 2011）．こうした生活史形質をもつ種では，ひとたび個体数が減少すると，個体群が元の状態に回復するのは極めて困難となる．気候変動に起因する生活史イベントのずれが繁殖成績を低下させるものであった場合，冬眠するコウモリの多くは，個体群縮小の危機に曝されることになるだろう．こうした懸念から，最近では，生活史イベントのタイミングに生じた変化をモニタリングする重要性が指摘されている（Wells et al., 2022）．同様に，複数の種を対象として，冬眠にかかわる生理的性質が温度変化にどのように反応するかを調べ，気候変動に対する脆弱性を理解することも重要であろう．例えば，北米に生息する 13 種について，温度変化に対する休眠時代謝率の反応と，水分損失率を複数の地域で測定・比較した研究では，種または種群レベルで明瞭な違いがみられている（McGuire et al., 2021）．代謝速度が上昇し始める環境温度の下限値は，2℃未満から 8℃と，種によって大きな違いがある．一方，水分損失率については，損失率の高い種群と，低い種群の 2 グループに分けられた．特に，水分損失率の高いグループには，white-nose syndrome によって個体群が著しく縮小した種も含まれていた．こうした知見は，気候変動に伴う環境変化に対し，それぞれの種が潜在的にどの程度，対応できるかを予測する上で有用な知見となるだろう（McGuire et al., 2021, 2022）．

「はじめに」で述べたように，近年では，野外個体群にも適用可能な調査手法（温度感知型テレメトリー発信器，高解像度赤外線サーモグラフィー，個体識別用 PIT タグ，音声録音装置など）が充実化しつつある．これらの技術を活用し，日本でも気候変動がコウモリの越冬戦略やフェノロジーに及ぼす影響を，個体，個体群，あるいは群集レベルで定量的に予測・評価していく必要性がある．

参考文献

Altringham, J. D. (2011). Torpor and hibernation. In *Bats From Evolution to Conservation 2nd edition* (Altringham, J. D., ed) Oxford University Press, 97–112.

Barclay, R. M. R., & Harder, L. D. (2005). Life histories of bats: Life in the slow lane. In *Bat Ecology* (Kunz, T. H. and Fenton, M. B., eds) The University of Chicago Press, 209–253.

Bernard, R. F., Wilcox, E. V., Jackson, R. T., Brown, V. A., & McCracken, G. F. (2021). Feasting, not fasting: winter diets of cave hibernating bats in the United States. *Front Zool*, **18**, https://doi.org/10.1186/s12983-021-00434-9

Blehert, D. S., Hicks, A. C., Behr, M., Meteyer, C. U., Berlowski-Zier, B. M., Buckles, E. L., Coleman, J. T. H., Darling, S. R., Gargas, A., Niver, R., Okoniewski, J. C., Rudd, R. J., & Stone, W. B. (2009). Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science*, **323**(5911), 227. 10.1126/science.1163874

Boratyński, J. S., Rusiński, M., Kokurewicz, T., Bereszyński, A., & Wojciechowski, M. S. (2012). Clustering behavior in wintering greater mouse-eared bats *Myotis myotis* — the effect of micro-environmental conditions. *Acta Chiropt*, **14** (2), 417–424. https://doi.org/10.3161/150811012X661738

Boratyński, J. S., Willis, C. K. R., Jefimow, M., & Wojciechowski, M. S. (2015). Huddling reduces evaporative water loss in torpid Natterer's bats, *Myotis nattereri*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **179**, 125–132. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.035

Boyles, J. G., & Robbins, L. W. (2006). Characteristics of summer and winter roost trees used by evening bats (*Nycticeius humeralis*) in southwestern Missouri. *Am. Midl. Nat.*, **155**, 210–220. https://doi.org/10.1674/0003-0031(2006)155[0210:COSAWR]2.0.CO;2

Boyles, J. G., Dunbar, M. B., & Whitaker, J. O. (2006). Activity following arousal in winter North American vespertilionid bats. *Mamm Rev,* **36**(4), 267–280. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2006.00095.x

Boyles, J. G., Dunbar, M. B., Strom, J. J., & Brack Jr, V. (2007). Energy availability influences microclimate selection of hibernating bats. *J. Exp. Biol.,* **210**, 4345–4350. doi:10.1242/jeb.007294

Boyles, J. G., Storm, J. J., & Brack Jr, V. (2008). Thermal benefits of clustering during hibernation: a field test of competing hypotheses on *Myotis sodalis*. *Func. Ecol.*, **22**, 632–636. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01423.x

Boyles, J. G., Boyles, E., Dunlap, R. K., Johnson, S. A., & Brack Jr, V. (2017). Long-term microclimate measurements add further evidence that there is no "optimal" temperature for bat hibernation. *Mamm. Biol.*, **86**, 9–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2017.03.003

Boyles, J. G., Johnson, J. S., Blomberg, A., & Lilley, T. M. (2020). Optimal hibernation theory. *Mamm Rev*, **50**, 91–100. doi: 10.1111/mam.12181

Czenze, Z. J., Park, A. D., & Willis, C. K. R. (2013). Staying cold through dinner: cold-climate bats rewarm with conspecific but not sunset during hibernation. *J Comp Physiol B*, **183**, 859–866. DOI 10.1007/s00360-013-0753-4

Czenze, Z. J., & Willis, C. K. R. (2015). Warming up and shipping out: arousal and emergence timing in hibernating little brown bats (*Myotis lucifugus*). *J Comp Physiol B*, **185**, 575–586. DOI 10.1007/s00360-015-0900-1

Czenze, Z. J., Brigham, R. M., Hickey, A. J. R., & Parsons, S. (2017a). Cold and alone? Roost choice and season affect torpor patterns in lesser short-tailed bats. *Oecologia*, **183**, 1–8. DOI 10.1007/s00442-016-3707-1

Czenze, Z. J., Jonasson, K. A., & Willis, C. K. R. (2017b). Thrifty females, frisky males: winter energetics of hibernating bats from a cold climate. *Physiol. Biochem. Zool.*, **90**(4), 502–511. DOI: 10.1086/692623

Day, K. M., & Tomasi, T. E. (2014). Winter energetics of female Indiana bats *Myotis sodalis*. *Physiol. Biochem. Zool.*, **87**(1), 56–64. DOI: 10.1086/671563

De Bruyn, L., Gyseling, R., Kirkpatrick, L., Rachwald, A., Apoznański, G., & Kokurewicz, T. (2021). Temperature driven hibernation site use in the Western barbastelle *Barbastella barbastellus* (Schreber, 1774). *Sci. Rep.*, **11**, https://doi.org/10.1038/s41598-020-80720-4

Fasel, N. J., Kołodziej-Sobocińska, M., Komar, E., Zegarek, M., & Ruczyński, I. (2019). Penis size and sperm quality, are all bats grey in the dark? *Curr. Zool.*, **65**(6), 697–703. doi: 10.1093/cz/zoy094

Festa, F., Ancillotto, L., Santini, L., Pacifici, M., Rocha, R., Toshkova, N., Amorim, F., Benítez-López, A., Domer, A., Hamidović, D., Kramer-Schadt, S., Mathews, F., Radchuk, V., Rebelo, H., Ruczynski, I., Solem, E., Tsoar, A., Russo, D., & Razgour, O. (2022). Bat responses to climate change: a systematic review. *Biol. Rev*., early view, https://doi.org/10.1111/brv.12893

Forrest, J. RK. (2016). Complex responses of insect phenology to climate change. Curr. Opin. Insect Sci., 17, 49–54. http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2016.07.002

Geiser, F. (2013). Hibernation. *Curr. Biol.*, **23**(5), R188-R193. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.062

Grigg, G. C., Beard, L. A., & Augee, M. L. (2004). The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds. *Physiol. Biochem. Zool.*, **77**(6), 982–997. https://doi.org/10.1086/425188

Harvey, J. A., Heinen, R., Gols, R., & Thakur, M. P. (2020). Climate change-mediated temperature extremes and insects: From outbreaks to breakdowns. *Glob Change Biol*, **26**, 6685–6701. DOI: 10.1111/gcb.15377

Hayman, D. T. S., Cryan, P. M., Fricker, P. D., & Dannemiller, N. G. (2017). Long-term video surveillance and automated analyses reveal arousal patterns in groups of hibernating bats. *Methods Ecol. Evol.*, **8**(12), 1813–1821. https://doi.

org/10.1111/2041-210X.12823

Hope, P. R., & Jones, G. (2012). Warming up for dinner: torpor and arousal in hibernating Natterer's bats (*Myotis nattereri*) studied by radio telemetry. *J. Comp. Physiol. B*, **182**, 569-578. DOI 10.1007/s00360-011-0631-x

Humphries, M. M., Thomas, D. W., & Kramer, D. L. (2003). The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol. Biochem. Zool.*, **76**(2), 165-179. https://doi.org/10.1086/367950

Jonasson, K. A., & Willis, C. K. R. (2011). Changes in body condition of hibernating bats support the thrifty female hypothesis and predict consequences for populations with white-nose syndrome. *PLoS One*, **6**(6), e21061. doi:10.1371/journal.pone.0021061

Jonasson, K. A., & Willis, C. K. (2012). Hibernation energetics of free-ranging little brown bats. *J. Exp. Biol.,* **215**(Pt 12), 2141-2149. doi:10.1242/jeb.066514

Jones, G., & Rayner, J. M. V. (1988). Flight performance, foraging tactics and echolocation in free-living Daubenton's bats *Myotis duubentoni* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Zool. Lond.*, **215**, 113-132. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04888.x

Jones, G., & Teeling, E. C. (2006). The evolution of echolocation in bats. *Trends Ecol. Evol.*, **21**(3), 149-156. doi:10.1016/j.tree.2006.01.001.

Keicher, L., Shipley, J. R., Komar, E., Ruczyński, I., Schaeffer, P. J., & Dechmann, D. K. N. (2022). Flexible energy-saving strategies in female temperate-zone bats. *J Comp Physiol B.*, **192**(6), 805-814. doi:10.1007/s00360-022-01452-7

Kim, S. S., Choi, Y. S., & Yoo, J. C. (2019). Regional differences in winter activity of hibernating greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) from Korea. *J. Ecol. Environ.*, **43**, https://doi.org/10.1186/s41610-018-0097-9

Kunz, T. H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1223**, 1-38. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x.

Linton, D. M., & Macdonald, D. W. (2018). Spring weather conditions influence breeding phenology and reproductive success in sympatric bat populations. *J. Anim. Ecol.*, **87**(4), 1080-1090. doi:10.1111/1365-2656.12832.

Loeb, S. C., & Winters, E. A. (2022). Changes in hibernating tricolored bat (*Perimyotis subflavus*) roosting behavior in response to white-nose syndrome. *Ecol. Evol.*, **12**(7), e9045. doi:10.1002/ece3.9045.

McGuire, L. P., Fuller, N. W., Dzal, Y. A., Haase, C. G., Klüg-Baerwald, B. J., Silas, K. A., Plowright, R. K., Lausen, C. L., Willis, C. K. R, & Olson, S. H. (2021). Interspecific variation in evaporative water loss and temperature response, but not metabolic rate, among hibernating bats. *Sci Rep.*, **11**(1), 20759. doi:10.1038/s41598-021-00266-x.

McGuire, L. P., Fuller, N. W., Dzal, Y. A., Haase, C. G., Silas, K. A., Willis, C. K. R., Olson, S. H., & Lausen, C. L. (2022). Similar hibernation physiology in bats across broad geographic ranges. *J Comp Physiol B.*, **192**(1), 171-181. doi:10.1007/s00360-021-01400-x

Meier, F., Grosche, L., Reusch, C., Runkel, V., van Schaik, J., & Kerth, G. (2022). Long-term individualized monitoring of sympatric bat species reveals distinct species- and demographic differences in hibernation phenology. *BMC Ecol Evol.*, **22**(1), 7. doi:10.1186/s12862-022-01962-6.

Meyer, G. A., Senulis, J. A., Reinartz, J. A. (2016). Effects of temperature and availability of insect prey on bat emergence from hibernation in spring. *J. Mammal.*, **97**(6), 1623-1633. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw126

Mormann, B. M., & Robbins, L. W. (2007). Winter roosting ecology of eastern red bats in southwest Missouri. *J. Wildl. Manage.*, **71**, 213-217. https://doi.org/10.2193/2005-622

Nagy, K. A., Girard, I. A., & Brown, T. K. (1999). Energetics of free-ranging mammals, reptiles, and birds. *Annu. Rev. Nutr.*, **19**, 247-277. doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.247

Neuweiler, G. (2000). *The biology of bats* (Neuweiler, G., ed) Oxford University Press.

Norquay, K. J. O., & Willis, C. K. R. (2014). Hibernation phenology of *Myotis lucifugus*. *J. Zool.*, **294**, 85-92. https://doi.org/10.1111/jzo.12155

Orr, T. J. & Zuk, M. (2013). Does delayed fertilization facilitate sperm competition in bats? *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **67**, 1903-1913. doi:10.1007/s00265-013-1598-2

Park, K. J., Jones, G., & Ransome, R. D. (2000). Torpor, Arousal and Activity of Hibernating Greater Horseshoe Bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Funct. Ecol.*, **14**(5), 580-588. http://www.jstor.org/stable/2656391

Prevéy, J., Vellend, M., Rüger, N., Hollister, R. D., Bjorkman, A. D., Myers-smith, I. H., Elmendorf, S. C., Clark, K., Cooper, E. J., Elberling, B., Fosaa, A. M., Henry, G. H. R., Høye, T. T., Jónsdóttir, I. S., Klanderud, K., Lévesque, E., Mauritz, M., Molau, U., Natali, S. M., … Rixen, C. (2017). Greater temperature sensitivity of plant phenology at colder sites: implications for convergence across northern latitudes. *Glob. Change Biol.*, **23**, 2660-2671. https://doi.org/10.1111/gcb.13619

Racey, P. A., & Entwistle, A. G. (2000). Life-history and reproductive strategies of bats. In *Reporoductive Biology of Bats* (Crichton, E. G., & Krutzsch, P. H., eds) Academic Press, 363-414.

Racey, P. A. (1979). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *J. Reprod. Fertil.*, **56**, 391-402. doi:10.1530/jrf.0.0560391

Reeder, D. M., Frank, C. L., Turner, G. G., Meteyer, C. U., Kurta, A., Britzke, E. R., Vodzak, M. E., Darling, S. R., Stihler, C. W., Hicks, A. C., Jacob, R., Grieneisen, L. E., Brownlee, S. A., Muller, L. K., & Blehert, D. S. (2012). Frequent arousal from hibernation linked to severity of infection and mortality in bats with white-nose syndrome. *PloS one*, **7**(6), e38920. https://doi.org/10.1371/journal.

pone.0038920

Ruf, T., & Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev.*, **90**(3), 891–926. https://doi.org/10.1111/brv.12137

Shen, Y. Y., Liang, L., Zhu, Z. H., Zhou, W. P., Irwin, D. M., & Zhang, Y. P. (2010). Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**(19), 8666–8671. https://doi.org/10.1073/pnas.0912613107

Siemers, B. M., & Schnitzler, H. U. (2004). Echolocation signals reflect niche differentiation in five sympatric congeneric bat species. *Nature*, **429**(6992), 657–661. https://doi.org/10.1038/nature02547

Speakman, J. R., & Thomas, D. W. (2003). Physiological ecology and energetics of bats. In *Bat Ecology* (Kunz, T. H., & Fenton, M. B., eds), University of Chicago Press, 430–490.

Stawski, C. (2012). Comparison of Variables of Torpor Between Populations of a Hibernating Subtropical/Tropical Bat at Different Latitudes. In *Living in a Seasonal World* (Ruf, T., Bieber, C., Arnold, W., & Millesi, E. eds), Springer, 99–108.

Stawski, C., Willis, C. K. R., & Geiser, F. (2014). The importance of heterothermy in bats. *J. Zool.*, **292**, 86–100. https://doi.org/10.1111/jzo.12105

Swift, S., & Racey, P. (2002). Gleaning as a foraging strategy in Natterer's bat *Myotis nattereri*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **52**, 408–416. https://doi.org/10.1007/s00265-002-0531-x

Taylor, L. R. (1963). Analysis of the Effect of Temperature on Insects in Flight. *J. Anim. Ecol.*, **32**(1), 99–117. https://doi.org/10.2307/2520

Thomas, D. W., Fenton, M. B., & Robert M. R. Barclay. (1979). Social Behavior of the Little Brown Bat, *Myotis lucifugus*: I. Mating Behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **6**(2), 129–136. http://www.jstor.org/stable/4599268

Thomas, D. W., Dorais, M., & Bergeron, J.-M. (1990). Winter Energy Budgets and Cost of Arousals for Hibernating Little Brown Bats, *Myotis lucifugus*. *J. Mammal.*, **71**(3), 475–479. https://doi.org/10.2307/1381967

Turbill, C., Bieber, C., & Ruf, T. (2011). Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. *Proc. Biol. Sci.*, **278**(1723), 3355–3363. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0190

Verant, M. L., Boyles, J. G., Waldrep, W., Jr, Wibbelt, G., & Blehert, D. S. (2012). Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. *PloS one*, **7**(9), e46280. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046280

Warnecke, L., Turner, J. M., Bollinger, T. K., Lorch, J. M., Misra, V., Cryan, P. M., Wibbelt, G., Blehert, D. S., & Willis, C. K. (2012). Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**(18), 6999–7003. https://doi.org/10.1073/pnas.1200374109

Webb, P. I., Speakman, J. R., & Racey, P. A. (1996). How hot is a hibernaculum? A review of the temperatures at which bats hibernate. *Can. J. Zool.*, **74**(4), 761–765. https://doi.org/10.1139/z96-087

Wells, C. P., Barbier, R., Nelson, S., Kanaziz, R. and Aubry, L. M. (2022). Life history consequences of climate change in hibernating mammals: a review. *Ecography*, **2022**, e06056. https://doi.org/10.1111/ecog.06056

Whitaker, J. O., Rose, R. K., & Padgett, T. M. (1997). Food of the Red Bat *Lasiurus borealis* in Winter in the Great Dismal Swamp, North Carolina and Virginia. *Am. Mid. Nat.*, **137**(2), 408–411. https://doi.org/10.2307/2426862

Willis, C. K. R. (2017). Trade-offs Influencing the Physiological Ecology of Hibernation in Temperate-Zone Bats. *Integr. Comp. Biol.*, **57**(6), 1214–1224. https://doi.org/10.1093/icb/icx087

Wojciechowski, M. S., Jefimow, M., & Tegowska, E. (2007). Environmental conditions, rather than season, determine torpor use and temperature selection in large mouse-eared bats (*Myotis myotis*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **1047**(4), 828–840. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.039

低温科学 81 （2023） 99–108
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 99

哺乳類の寒冷適応における褐色脂肪組織の役割

加藤（鈴木） 美羅[1)]，岡松 優子[1)]

2022 年 12 月 15 日受付，2023 年 1 月 16 日受理

哺乳類には，白色と褐色の 2 種類の脂肪組織が存在する．白色脂肪組織はエネルギーを中性脂肪として貯蔵する役割を担うのに対し，褐色脂肪組織はミトコンドリアの脱共役タンパク質 1（UCP1）により熱を産生する非震え熱産生の部位である．哺乳類は寒冷刺激を受けると交感神経を介して褐色脂肪組織の熱産生を活性化し，体温の低下を防ぐ．寒冷刺激が長期に渡ると褐色脂肪組織が増生するとともに，白色脂肪組織中に UCP1 を発現するベージュ脂肪細胞が誘導され（白色脂肪の褐色化），個体レベルの熱産生能が増大して寒冷環境に適応する．本稿では，寒冷適応における脂肪組織の変化とその分子機序を概説するとともに，動物種による褐色脂肪組織の発達や機能の違いについて紹介する．

The role of brown adipose tissue in adaptation to cold environment

Mira Kato-Suzuki[1] and Yuko Okamatsu-Ogura[1]

Brown adipose tissue is a site for non-shivering thermogenesis by mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). Cold stimulation activates heat production in brown adipose tissue via the sympathetic nervous system, preventing a decrease in body temperature. Prolonged cold stimulation causes the hyperplasia of brown adipose tissue, and induces UCP1-expressing beige adipocytes in white adipose tissue. This remodeling of adipose tissues increases the thermogenic capacity at the individual level and improves adaptation to the cold environment. In this section, the molecular mechanisms of adipose tissue remodeling during cold adaptation and species-dependent differences in the development and the function of brown adipose tissue in mammals are discussed.

キーワード：褐色脂肪，寒冷適応，熱産生，脱共役タンパク質 1
Brown adipose tissue, cold adaptation, Thermogenesis, UCP1

1．はじめに

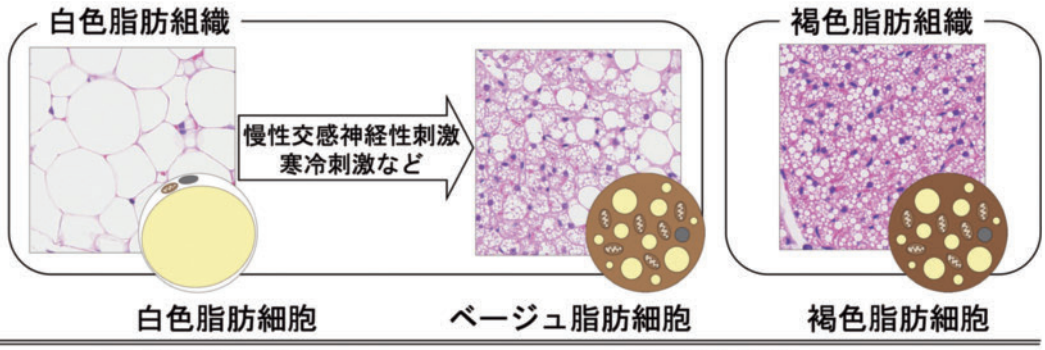
恒温動物である哺乳類が寒冷にさらされると，立毛や皮膚血管の収縮により体表からの熱放散が抑えられるとともに，熱産生が活発化して体温が維持される．このような適応的熱産生は，骨格筋による震え熱産生とそれ以外の非震え熱産生に大別され，後者の非震え熱産生を担うのが褐色脂肪組織である．本稿では，哺乳類について寒冷環境での体温維持や寒冷適応における褐色脂肪組織の役割について概説する．

連絡先
岡松 優子
北海道大学大学院獣医学研究院生化学教室
〒060–0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目
Tel. 011–706–5205
e-mail：y-okamatau@vetmed.hokudai.ac.jp
1）北海道大学大学院獣医学院生化学教室
Laboratory of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University (Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060–0818, Japan)

2．褐色脂肪組織による熱産生

2.1 脱共役タンパク質 1（Uncoupling protein 1：UCP1）

哺乳類には，白色と褐色の 2 種類の脂肪組織が存在する（図 1）．白色脂肪組織に存在する白色脂肪細胞は余剰なエネルギーを細胞内の大きな単一の脂肪滴（単房性脂



	白色脂肪細胞	ベージュ脂肪細胞	褐色脂肪細胞
細胞形態	単房性脂肪滴 ミトコンドリア：少	多房性脂肪滴 ミトコンドリア：多	
存在形態	既存	誘導	既存
機能	エネルギーを 貯蔵・放出する	ミトコンドリア内膜にUCP1を発現し 非震え熱産生を行う	

図 1：3 種類の脂肪細胞
哺乳類には白色および褐色脂肪組織が存在する．寒冷などの交感神経性刺激により，白色脂肪組織においてベージュ脂肪細胞と呼ばれる多房性脂肪滴と豊富なミトコンドリアを含む褐色脂肪細胞様の細胞が出現する．褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞はミトコンドリア内膜に脱共役タンパク質 1（UCP1）を発現し，エネルギーを熱として散逸する．

肪滴）に中性脂肪として蓄積し，必要に応じて脂肪酸として血中に放出して全身にエネルギーを供給する．また，様々なアディポカインを分泌し，全身代謝を制御する．非震え熱産生を担う褐色脂肪組織はミトコンドリアと血管に富む茶褐色の脂肪組織である．構成する褐色脂肪細胞は中性脂肪を蓄える脂肪細胞としての特徴は有しているものの，形態は白色脂肪細胞とは著しく異なり，小さい脂肪滴を複数含む（多房性脂肪滴）．豊富なミトコンドリアには熱産生を担う脱共役タンパク質 1（UCP1）が存在する．ミトコンドリアでは，電子伝達系により生じる内膜を隔てたプロトン濃度勾配を利用して ATP が合成されるが，UCP1 は ATP 合成を伴わずにプロトン濃度勾配を解消し，そのエネルギーが熱に変換される．脊椎動物では 5 種類の UCP が同定されており，中でも UCP1 と比較的近縁な分子として UCP2 と UCP3 が存在するが，ヒトにおけるアミノ酸の相同性は UCP1-UCP2 間で 56%，UCP1-UCP3 間で 58%であり，UCP2 や UCP3 の全身レベルでの熱産生への寄与は明確には示されていない．

2.2 褐色脂肪組織による熱産生の制御

褐色脂肪組織における熱産生は，交感神経によって支配されている．図 2A に示すように，寒冷刺激は体表の温度受容器 transient receptor potential（TRP）チャネル（齋藤の稿参照）で感受され体性感覚神経を介して脳に伝わり，褐色脂肪組織を支配する交感神経が活性化する（Saito et al., 2020）．交感神経末端から放出されるノルアドレナリンは褐色脂肪細胞の β アドレナリン受容体に結合し，細胞内ではアデニル酸シクラーゼ，プロテインキナーゼ A（PKA），ホルモン感受性リパーゼなどの酵素が順次活性化し，中性脂肪から脂肪酸が遊離する．遊離脂肪酸は熱産生の基質として利用されると同時に，UCP1 を直接活性化する．白色脂肪組織ではノルアドレナリンにより同様のシグナル経路が活性化し，中性脂肪から遊離した脂肪酸が血中に放出される．褐色脂肪組織は脂肪酸を積極的に取り込んで熱産生の基質として利用する．体温調節におけるこの熱産生経路の重要性は UCP1 欠損マウス（Enerbäck et al., 1997）のみならず，ノルアドレナリンやアドレナリンを産生できないドーパミン β-ヒドロキシラーゼ欠損マウス（Thomas & Palmiter, 1997）やアドレナリン β 受容体の全てのサブタイプ（β1，β2，β3）を欠損した β-less マウス（Jimenez et al., 2002）などが寒冷に暴露されると体温を維持できず，死に至る（寒冷不耐性）ことからも明らかである．なお，齧歯類の褐色脂肪細胞には α および β アドレナリン受容体が発現しており，上記の UCP1 活性化・熱産生の制御には β3 アドレナリン受容体が重要である．一方，ヒト褐色脂肪細胞の制御にどの受容体サブタイプが主に機能しているかについては議論があるところであり，β3 よりも β1 や β2 アドレナリン受容体が主要な役割を果たす可能性も報告されている（Blondin et al., 2020; Riis-Vestergaard et al., 2020）．

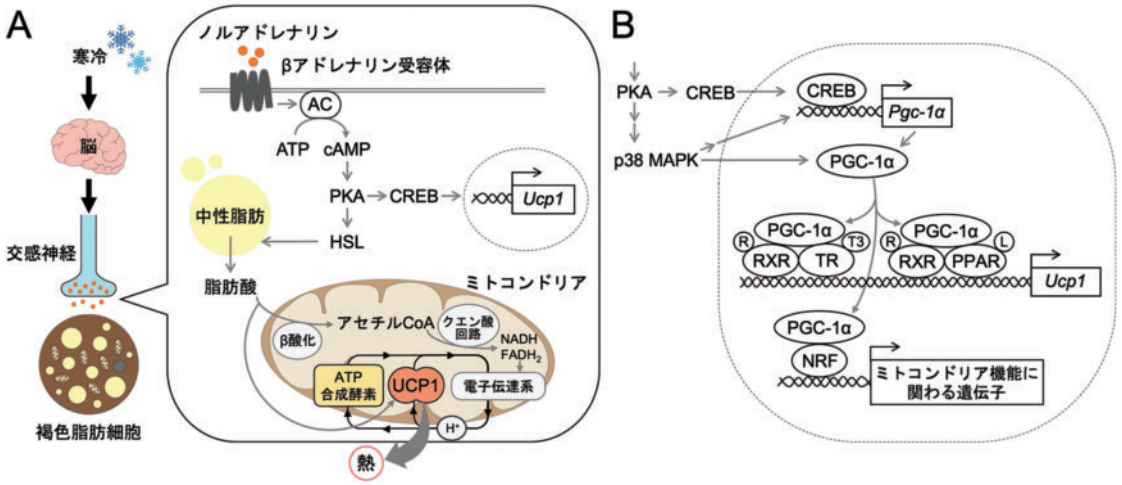


図 2：交感神経による UCP1 の活性化と発現調節
A）寒冷刺激は体性感覚神経を介して脳に伝わり，交感神経を介して褐色脂肪組織を活性化する．交感神経末端から放出されたノルアドレナリンはβアドレナリン受容体を介してアデニル酸シクラーゼ（AC）を活性化，サイクリック AMP（cAMP）の濃度上昇によりプロテインキナーゼ A（PKA），ホルモン感受性リパーゼ（HSL）が順次活性化して，中性脂肪から脂肪酸が遊離する．遊離脂肪酸は熱産生の基質として利用されると同時に，UCP1 を直接活性化する．B）活性化された PKA は cAMP 応答配列結合タンパク質（CREB）をリン酸化し，ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター（PPAR）γ共役因子-1α（PGC-1α）の遺伝子発現を誘導する．PGC-1α は，PPARγ/レチノイド X 受容体（RXR）ヘテロダイマーなどと複合体を形成して UCP1 遺伝子発現を増強し，さらに核呼吸因子（NRF）のコアクチベーターとしてミトコンドリアの増生を促す．p38MAPK も PGC-1α の発現や活性を亢進させる．R：レチノイン酸，L：PPAR リガンド．

3．寒冷適応における脂肪組織の変化とその機序

3.1　褐色脂肪細胞の UCP1 量の増加

上述のように，哺乳類は寒冷刺激を受けると交感神経–褐色脂肪組織–UCP1 の経路を活性化して熱産生することにより体温の低下を防ぐが，寒冷刺激が長期間にわたると，褐色脂肪組織の UCP1 量やミトコンドリアが増加して熱産生能が亢進する（図 2B）．UCP1 遺伝子のプロモーター領域には，褐色脂肪細胞特異的にノルアドレナリンで活性化されるエンハンサー領域が存在し，転写因子 cAMP 応答配列結合タンパク質（CREB），ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPARγ），甲状腺ホルモン受容体（TR），レチノイド X 受容体（RXR）などの結合領域が含まれる．上述の通りアドレナリン刺激により活性化する PKA は転写因子 CREB をリン酸化し，活性化した CREB は直接 UCP1 遺伝子プロモーターに結合するだけでなく，PPARγ coactivator-1α（PGC-1α）の遺伝子発現を誘導する．PGC-1α は，PPARγ/RXR ヘテロダイマーなどと複合体を形成しして UCP1 遺伝子発現を増強し，さらに Nuclear respiratory factor（NRF）のコアクチベーターとしてミトコンドリアの増生を促す．PKA の下流で p38MAPK 経路も活性化し，PGC-1α 遺伝子の発現を誘導するとともに PGC-1α をリン酸化してコアクチベーター活性を亢進させる．以上のように，ノルアドレナリンの刺激は CREB や p38 MAPK の経路を介して PGC-1α の発現・活性を高め，UCP1 やミトコンドリアを増加することで褐色脂肪組織の熱産生機能の基盤を作る．PGC-1α 欠損マウスでは寒冷刺激による褐色脂肪組織での UCP1 発現誘導がおこらず，寒冷不耐性となる．

3.2　褐色脂肪組織の増生

寒冷環境下では，UCP1 量に加えて褐色脂肪細胞そのものの数も増加して組織が増生する．細胞数の増加は褐色脂肪組織を支配する交感神経を外科的に切除すると抑制され，ノルアドレナリン投与により回復することから，褐色脂肪組織の増生においてもやはり交感神経の活性化が必須であると考えられる（Géloën et al., 1992）．褐色脂肪組織には，UCP1 を発現する成熟褐色脂肪細胞に加えて，前駆脂肪細胞，間質細胞，血管内皮細胞など間質血管細胞群（Stromal-Vascular fraction）と呼ばれる複数の非脂肪細胞から構成されている．寒冷環境では前駆褐色脂肪細胞が増殖して褐色脂肪細胞へと分化して褐色脂肪細胞数が増加し，熱産生能が増強する．前駆褐色脂肪細胞にはβ3 アドレナリン受容体は発現しておらず，β1 アドレナリン受容体を介したシグナル経路により増殖が制御される．ノルアドレナリンは，CCAAT/エンハンサー結合タンパク質（C/EBP）α や PPARγ といった脂

肪細胞への分化に必須の因子の発現を抑制することで，細胞増殖を進行させる．また，ノルアドレナリンはPKA 経路の下流にある Src や ERK1/2 などのシグナル伝達因子を介して，DNA 合成に欠かせない酵素であるリボヌクレオチド還元酵素の遺伝子発現を増加させることが報告されている（Fredriksson & Nedergaard, 2002）．

このような前駆褐色脂肪細胞の増殖・分化に加えて，成熟褐色脂肪細胞も増殖して組織増成に寄与する．我々は，マウス褐色脂肪組織における細胞増殖マーカーの発現を組織学的に解析し，寒冷刺激により速やかに成熟褐色脂肪細胞が増殖し，その後数日をかけて前駆褐色脂肪細胞を含む間質血管細胞群が増殖することを見出した．間質血管細胞群の増殖は β1 アドレナリン受容体により制御されたのに対し，成熟褐色脂肪細胞の増殖は β3 アドレナリン受容体を介して制御されていた（Fukano et al., 2016）．さらに，成熟脂肪細胞に特異的な aP2（Fabp4）プロモーターを用いて細胞周期抑制タンパク質 p27 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは，寒冷刺激に応じた成熟褐色脂肪細胞の増殖が抑制され，褐色脂肪組織の増生が阻害されることを実証した（Okamatsu-Ogura et al., 2017）．一般に，分化した細胞は増殖能を失うが，褐色脂肪細胞は分化後にも増殖能を維持する特徴的な性質を有すると考えられる．後に，誘導型の褐色脂肪細胞であるベージュ脂肪細胞（後述）も同様に分化後の増殖能を有することが報告されている（Park et al., 2021）．

以上のように，寒冷環境において交感神経が持続的に活性化すると，UCP1 タンパク質レベルと褐色脂肪細胞の数が増加して，個体の熱産生能が増大する．さらに，褐色脂肪組織中で血管内皮細胞増殖因子の発現が増加して血管新生が活発化し，褐色脂肪細胞が産生する熱は血液により効率よく全身に運ばれる．我々は，マウスを室温 10℃ の寒冷環境で 3 週間飼育した際の UCP1 量と熱産生能の変化について単離褐色脂肪細胞を用いて調べたが，褐色脂肪細胞あたりの UCP1 量は寒冷馴化により 2.7 倍に増加したのに対し，ノルアドレナリンで活性化した際の熱産生量の増加は 1.3 倍程度にとどまった（Okamatsu-Ogura et al., 2013）．熱産生能の増大には UCP1 以外の構成因子も増加する必要があるため，単純に UCP1 の量を増やすだけでは足りないと考えらえる．その観点からも，UCP1 量のみならず褐色脂肪細胞そのものを増加させることは個体の熱産生能の増加と寒冷適応において重要であると考えられる．

3.3　白色脂肪組織の褐色化

寒冷環境においては褐色脂肪組織のみならず白色脂肪組織にも大きな変化が生じる．図 3A に示すように，マウスの白色脂肪組織のほとんどの領域は単房性脂肪滴を含む白色脂肪細胞が占めるが（Day 0），寒冷環境で飼育すると徐々に多房性脂肪滴を持つ脂肪細胞が生じる．この細胞はベージュ（ブライト）脂肪細胞と呼ばれ，褐色脂肪細胞と同様に UCP1 を発現してノルアドレナリンの刺激に応じて熱を産生する．このような白色脂肪組織の変化は褐色化（Browning）と呼ばれ，哺乳類の寒冷適応変化の一つである．褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞は，形態と機能の両面で多くの類似点があるが発生過程での細胞起源が異なり，褐色脂肪細胞は筋肉と共通の Myf5 陽性細胞から生じるのに対し，ベージュ脂肪細胞

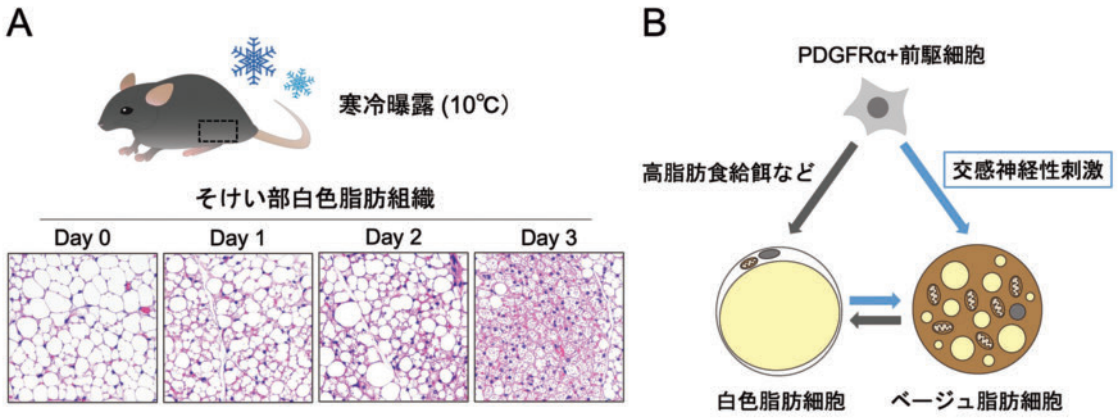


図 3：交感神経性刺激によるベージュ脂肪細胞の出現
A）C57BL6/J マウスを寒冷曝露し，そけい部白色脂肪組織を HE 染色により解析した．寒冷曝露により多房性脂肪滴を含む細胞が出現した．B）血小板由来成長因子受容体（PDGFR）α 陽性前駆細胞は白色 / ベージュ脂肪細胞の共通の前駆細胞であり，寒冷などの交感神経性刺激（青矢印）によりベージュ脂肪細胞へ分化する（Lee et al., 2012）．

は白色脂肪細胞と共通の Myf5 陰性細胞から生じる．体温調節におけるベージュ脂肪細胞の寄与には不明な点が残されているが，分泌因子を介して全身の糖代謝や脂質代謝を制御するなど，ベージュ脂肪細胞に特徴的な機能も報告されている（Okamatsu-Ogura & Saito, 2021）．寒冷刺激などにより出現したベージュ脂肪細胞では，刺激が解除されるとマイトファジーによりミトコンドリアが分解され，白色脂肪細胞に変化することが報告されている（Altshuler-Keylin et al., 2016）．

ベージュ脂肪細胞が白色脂肪細胞からの転換と前駆細胞からの分化のいずれにより生じるのかについては議論がある．一部のベージュ脂肪細胞は，既存の白色脂肪細胞から直接転換して生じるが，成熟脂肪細胞標識（AdipoChaser）マウスを用いた研究では，ベージュ脂肪細胞の多くは前駆細胞に由来することが示されている（Wang et al., 2013）．前駆ベージュ脂肪細胞マーカーについても複数の報告があり，複数種の前駆細胞に由来する可能性もある．例えば，マウス白色脂肪組織中に存在する血小板由来成長因子受容体 α（PDGFRα）を発現する PDGFRα 陽性細胞は，寒冷刺激に応じてベージュ脂肪細胞に，高脂肪食摂取では白色脂肪細胞に分化することが報告されている（図 3B）（Lee et al., 2012）．また，血管内皮細胞から分泌される PDGF-CC がベージュ脂肪細胞を誘導し，全身のエネルギー消費を高めることが報告されている（Seki et al., 2016）．PDGFRα 陽性細胞の数は加齢や肥満により低下し，白色脂肪組織の褐色化能を低下させる（Shin et al., 2017; Shin et al., 2019）．一方で，PDGFRα や PDGFRβ 欠損マウスでは，β3 アドレナリン受容体作動薬によるベージュ脂肪細胞の誘導が促進される（Sun et al., 2020）など不明な点も多く，さらなる研究が必要である．

3.4　UCP1 に依存しない熱産生経路

体サイズが小さい小型動物において，褐色/ベージュ脂肪細胞による非震え熱産生は寒冷環境での体温維持に必須であり，上述の通り UCP1 欠損マウス寒冷不耐性のため室温 4℃では体温が低下して死に至る．しかし，マイルドな寒冷環境（18℃）で 3 週間順化させると，UCP1 欠損マウスも野生型マウスと同様に 4℃で体温を維持する（Golozoubova et al., 2001）ことから，UCP1 に依存しない熱産生機構が存在することが示唆されてきた．近年，エネルギーを無駄遣いする回路（futile cycle）による熱産生の分子機序が明らかになってきている．褐色/ベージュ脂肪細胞においては，UCP1 以外にもリン酸化と脱リン酸化を繰り返すクレアチンサイクルや，小胞体からのカルシウム流出と再取り込みを繰り返すカルシウムサイクリング，中性脂肪の分解と再合成を繰り返す回路などが知られている（Okamatsu-Ogura & Saito, 2021）．

4．様々な動物種における褐色脂肪組織と寒冷適応

ここまでに述べてきた熱産生や寒冷適応に関する細胞分子機構は主にマウス・ラットなどの実験動物から得られた知見であるが，寒冷適応における褐色脂肪組織の役割には動物種ごとの生態・生理による違いがある．体のサイズに比して体表面積が大きい小動物ほど熱産生への寄与が高く，寒冷適応に不可欠である．また，成体の体サイズにかかわらず，哺乳類は出生の際に子宮からの娩出により急激な環境温度の低下を経験する．新生子期には震え熱産生機能が未熟であるため，この時期には褐色脂肪組織による熱産生が不可欠な役割を担っている．

4.1　早成性新生子の褐色脂肪組織

哺乳類は新生子の出生時の発達状態によって早成性と晩成性に分けられる．ウシやヒツジなど草食獣の多くや，一般的な小型哺乳類よりも妊娠期間が長いモルモット（マウス・ラットの 20 日前後に対し，モルモットは 60 日）などは，母体内で成長し発達してから生まれる早成性である．例えば産後すぐに目が開き，身体は体毛で覆われ，すぐに歩行が可能であるなどの特徴がある．このグループでは，褐色脂肪組織は胎子期に発達し，ほぼ完成した状態で出生する（図 4A）．出生に伴う環境温度の低下に対応して褐色脂肪組織が熱を産生して体温維持に寄与するが，出生直後から萎縮して熱産生機能を失う．しかし，出生後に寒冷環境で飼育すると萎縮のスピードは遅くなることから，環境温度の影響が大きいことがわかる．

それでは，寒冷環境に生息する動物種では褐色脂肪組織は消失しないだろうか．ゼニガタアザラシ（*Phoca vitulina*）は 4 月から 5 月下旬の出産期，北海道の沿岸部に生息している．成体のゼニガタアザラシは厚い皮下脂肪により体温を維持するが，新生子はほとんど体脂肪をもたない．我々がゼニガタアザラシの新生子の褐色脂肪組織を調べたところ，生後 1 週間以内の新生ゼニガタアザラシの頸部，肩甲間，腋下，心膜部に UCP1 を発現する褐色脂肪細胞が存在した（Sakurai et al., 2015）．しかし，1 歳では脂肪細胞は新生子の脂肪細胞と比較してはるかに大きな脂質滴を含み，UCP1 の発現量も少なかっ

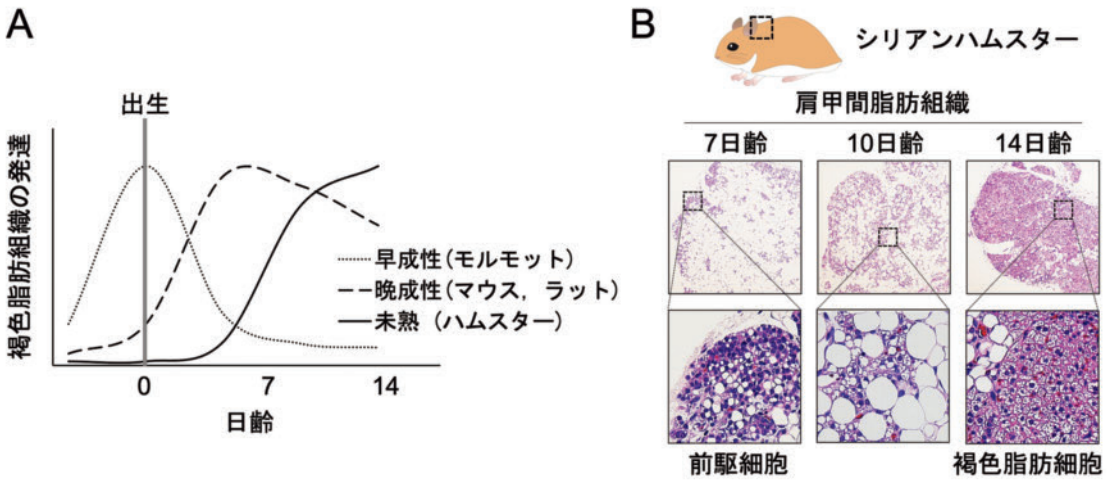


図 4：新生子の褐色脂肪組織とハムスター褐色脂肪組織の発達
A）早成性の新生子の褐色脂肪の発達は出生時に完了しており，その後退縮する．晩成性の新生子では出生後の寒冷刺激により発達する．未熟な新生子では出生後しばらくしてから発達する．B）シリアンハムスターの肩甲間脂肪組織を用いて HE 染色を行い，褐色脂肪組織の生後発達を評価した．脂肪組織の間質において前駆細胞が増殖して組織全体を置換し，褐色脂肪細胞へ分化することで褐色脂肪組織が形成された．

た．よって，他の大型哺乳類と同様に，ゼニガタアザラシも褐色脂肪組織が年齢とともに消失することが示唆された．一方，出生時に毛皮が密集しているズキンアザラシ（*Cystophora cristata*）や産毛のあるウェッデルアザラシ（*Leptonychotes weddellii*）では新生子にも褐色脂肪組織が見られないとの報告もあり（Pearson et al., 2014），新生子期の体温調節方法の違いにより褐色脂肪組織の発達に種間差が生まれるのかもしれない．

4.2 晩成性新生子の褐色脂肪組織

早成性の新生子とは異なり，晩成性の新生子はとても未発達な状態で産まれる．例えば，目は閉じたままで，身体は体毛に覆われない丸裸の状態である．早成性の新生子が 1 もしくは数匹（頭）で生まれるのに対し，このグループの動物は多産であり，多くは 5 匹以上の仔を産む．生後間もなくは，仔は群れることで身を寄せ合って寒さから身を守るが，体温を一定に維持する能力は既に持っている．これらの動物では，胎子期に褐色脂肪組織が形成され始めるが，出生後に急激に発達して数日で機能が最大となる．このグループにはラットやマウスが含まれる．UCP1 mRNA は胎児期には低レベルであり出生後 12–20 時間で 10 倍に増加するが，新生子を室温 35℃の温暖な条件で飼育すると認められない（Obregón et al., 1989）ことからラット新生子では出生後の寒冷刺激により褐色脂肪組織が発達すると考えられる．小型齧歯類では機能的な褐色脂肪組織が生涯にわたり豊富に存在するが，その他の動物では速やかに退縮し，例えば犬や猫では，生後 2–3 日で褐色脂肪組織機能が最大となり，1 週間程度で白色脂肪組織に置き換わり，成体では確認されない．しかし，イヌにおいても β3 アドレナリン受容体アゴニストの投与により白色脂肪組織の褐色化が誘導され，熱産生能を持つベージュ脂肪細胞が誘導される（Omachi et al., 2007）．

4.3 ハムスターの褐色脂肪組織

褐色脂肪組織は冬眠哺乳類から発見された組織であり，冬眠からの覚醒時に活発に熱を産生して体温を上昇させる．冬眠哺乳類であるシリアンハムスターにも豊富な褐色脂肪組織が存在するが，特徴的な形成機構を有する．他種動物では肩甲間に大きな褐色脂肪組織が存在するが，新生ハムスターでは白色脂肪組織が存在しており，図 4B に示すように出生後に徐々に褐色脂肪組織へと転換する．我々は，白色脂肪組織中で前駆細胞が増殖し，組織を置換して褐色脂肪細胞へと分化することで白色脂肪組織から褐色脂肪組織へと転換することを明らかにした（Okamatsu-Ogura et al., 2018）．若齢では褐色脂肪組織を持たないため，14 日齢頃までのハムスターは室温 23℃でも体温を維持できず，褐色脂肪組織が完成するとともに恒温性を獲得する（Tsubota et al., 2019）．恒温性を獲得するまでは，同腹仔で群がり，母親に覆い被されることで体温を維持していると考えられる．温暖環境で飼育しても白色から褐色への脂肪組織転換のスピードに違いはないので（Nagaya et al., 2019），外気温の影響ではなく細胞にプログラムされた機序により組織が発達す

ると考えられる．なぜハムスターにのみ特殊な組織形成機構が存在するのかは不明だが，冬眠哺乳類ゆえの寒冷耐性が褐色脂肪組織形成の遅延を許容している可能性はある．ハムスター以外にこのような発達過程をたどる動物種は今までのところ報告されていないが，他の冬眠哺乳類の褐色脂肪組織形成機構の解析が待たれる．

白色脂肪組織が褐色脂肪組織に転換するという現象は，3.3 で述べた白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が異なる細胞系譜を持つという事実と矛盾するようにも思われる．しかし，脂肪細胞の種類による細胞系譜の違いについては議論のあるところであり（Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Shan et al., 2013），分類は必ずしも明確ではない．また，褐色脂肪細胞の多房性脂肪滴は肥満や加齢によって単房性になり得る（Sellayah & Sikder, 2014; Shimizu et al., 2014）ことや，上述のように一部のベージュ脂肪細胞は白色脂肪細胞からの転換により発生することが示されている．これらを考え合わせると，ハムスターの新生子の肩甲間に存在する白色脂肪様細胞も，いわゆる白色脂肪細胞と同一ではなく，未熟な褐色脂肪細胞であることや，転換前のベージュ脂肪細胞であるという可能性も考えられる．実際，肩甲間に存在する白色脂肪様細胞は典型的な白色脂肪組織に存在する白色脂肪細胞とは遺伝子発現パターンに違いがあることを見出している（Mae et al., 2021）．これらの詳細を明らかにするにはさらなる研究が必要であろう．

4.4　ヒトの褐色脂肪組織

ヒト褐色脂肪組織は新生児に豊富に存在し，体重の約 5% を占める．上記のような晩成性動物と同様に，発達に伴って減少して成人には存在しないと考えられていたが，現在では成人にも機能的な褐色脂肪組織が存在し，実験動物で得られた知見に一致してエネルギー消費量の制御に寄与することが明らかになっている．2.2 で述べた通り，交感神経–褐色脂肪組織–UCP1 が活性化すると褐色脂肪細胞では熱産生の基質として脂肪酸の取り込みが活発化するが，同時にグルコースの取り込みも増加する（Inokuma et al., 2005; Okamatsu-Ogura et al., 2020）．この代謝特性を利用して，寒冷刺激等で活性化したヒト褐色脂肪組織を検出することができる（Saito et al., 2009）．図 5 は，放射ラベルしたグルコース誘導体（^{18}F-FDG）の集積を陽電子画像診断法（PET）により検出した結果である．夏において，寒冷条件で認められる鎖骨上窩の集積は温暖条件では認められない．同時に撮影している CT 像からは脂肪組織であることが確認できるので，寒冷刺激により活性化した褐色脂肪組織であると言える．同一被験者の同じ撮影を冬季に行うと，鎖骨上窩の集積が増えるとともに傍脊柱にも集積が認められた．ヒト褐色脂肪組織の存在量には個人差が存在するが，実験動物から得られた知見と同様に，ヒトにおいても寒冷環境により褐色脂肪組織が増生すると考えられる．実験的にも，1 日のうち 2 時間を室温 16 度で過ごす寒冷暴露

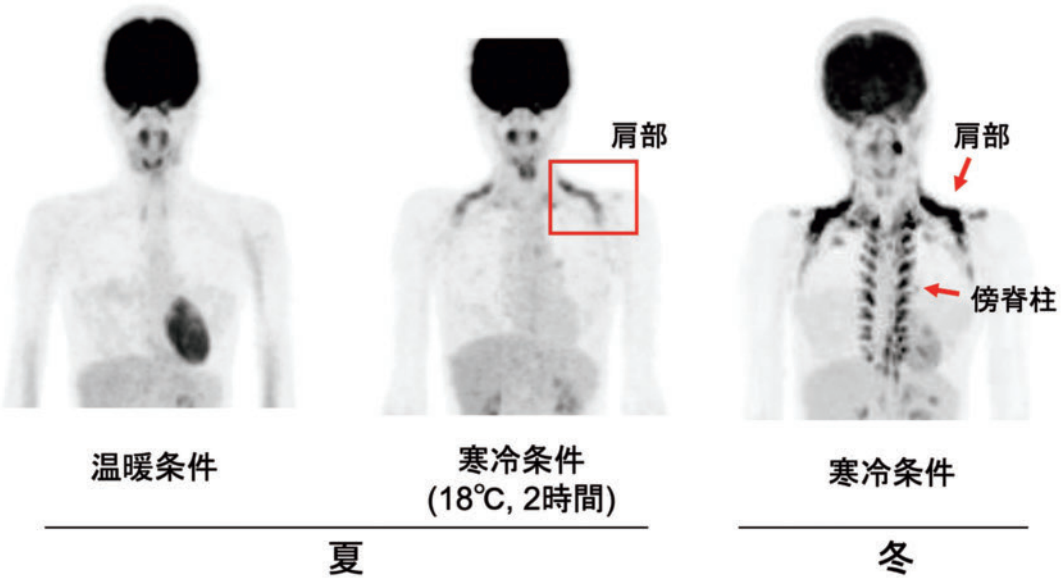


図 5：ヒトの褐色脂肪と寒冷適応
18F-FDG-PET/CT によるヒト褐色脂肪の検出：寒冷刺激（18℃，2 時間）によるフルオロデオキシグルコース（fluorodeoxyglucose：FDG）の集積を PET-CT により検出した．脳や心臓などの糖代謝活性の高い部位に加え，肩部や腋下，傍脊柱に集積がみられる．この集積は，夏よりも冬に増加した．

を 6 週間続けるとヒト褐色脂肪組織が増加することも示されている（Yoneshiro et al., 2013）.

興味深いことに，成人の褐色脂肪組織は主にベージュ脂肪細胞で構成されていることが報告された（Shinoda et al., 2015）．新生児の褐色脂肪組織は齧歯類に存在する褐色脂肪細胞（古典的褐色脂肪細胞）からなるものの，成長とともに消失することが示唆されている．褐色脂肪の量や活性が民族間（Bakker et al., 2014）や，出生時期により（Sun et al., 2018）異なることが報告されており，今後の研究の進展が期待される.

5．最後に

本稿では哺乳類の寒冷適応における褐色脂肪組織の役割を紹介した．様々な動物の褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞について，種間の違いやその理由を明らかにすることは，熱産生機構の根本的な理解につながるだろう．近年，褐色脂肪組織の量や機能が出生前の環境により規定されるとの報告が相次いでいる．例えば，受精時期に父親が寒冷刺激を受けると子供の成長後の褐色脂肪量が増加し（Sun et al., 2018），母親が肥満していると胎児の褐色脂肪組織の発達が阻害され出生後の熱産生能が低下する（Chen et al., 2021）．同じ環境にいても，寒がりや暑がりの人がいたり，同じ食事量でも太りやすさが異なるなど，褐色脂肪組織に関連する体質の個人差を規定する分子機序についての理解が進むことが期待される.

参考文献

Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., . . . Kajimura, S. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab*, *24*(3), 402–419. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.002

Bakker, L. E., Boon, M. R., van der Linden, R. A., Arias-Bouda, L. P., van Klinken, J. B., Smit, F., . . . Rensen, P. C. (2014). Brown adipose tissue volume in healthy lean south Asian adults compared with white Caucasians: a prospective, case-controlled observational study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *2*(3), 210–217. https://doi.org/10.1016/s2213-8587(13)70156-6

Blondin, D. P., Nielsen, S., Kuipers, E. N., Severinsen, M. C., Jensen, V. H., Miard, S., . . . Carpentier, A. C. (2020). Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β2-AR Stimulation. *Cell Metab*, *32*(2), 287–300.e287. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.005

Chen, Y. T., Yang, Q. Y., Hu, Y., Liu, X. D., de Avila, J. M., Zhu, M. J., . . . Du, M. (2021). Imprinted lncRNA Dio3os preprograms intergenerational brown fat development and obesity resistance. *Nat Commun*, *12*(1), 6845. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27171-1

Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E., & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, *387*(6628), 90–94. https://doi.org/10.1038/387090a0

Fredriksson, J. M., & Nedergaard, J. (2002). Norepinephrine specifically stimulates ribonucleotide reductase subunit R2 gene expression in proliferating brown adipocytes: mediation via a cAMP/PKA pathway involving Src and Erk1/2 kinases. *Exp Cell Res*, *274*(2), 207–215. https://doi.org/10.1006/excr.2002.5470

Fukano, K., Okamatsu-Ogura, Y., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., & Kimura, K. (2016). Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a ss3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One*, *11*(11), e0166579. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166579

Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb j*, *15*(11), 2048–2050. https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje

Géloën, A., Collet, A. J., & Bukowiecki, L. J. (1992). Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. *Am J Physiol*, *263*(6 Pt 2), R1176–1181. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.6.R1176

Inokuma, K., Ogura-Okamatsu, Y., Toda, C., Kimura, K., Yamashita, H., & Saito, M. (2005). Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*, *54*(5), 1385–1391. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1385

Jimenez, M., Léger, B., Canola, K., Lehr, L., Arboit, P., Seydoux, J., . . . Preitner, F. (2002). Beta (1) /beta (2) /beta (3) -adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS Lett*, *530*(1–3), 37–40. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03387-2

Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*, *15*(4), 480–491. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009

Mae, J., Nagaya, K., Okamatsu-Ogura, Y., Tsubota, A., Matsuoka, S., Nio-Kobayashi, J., & Kimura, K. (2021). Adipocytes and Stromal Cells Regulate Brown Adipogenesis Through Secretory Factors During the Postnatal White-to-Brown Conversion of Adipose Tissue in Syrian Hamsters. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 698692. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.698692

Nagaya, K., Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Nakagiri, S., Tsubota, A., & Kimura, K. (2019). Effect of ambient temperature on the proliferation of brown adipocyte

progenitors and endothelial cells during postnatal BAT development in Syrian hamsters. *J Physiol Sci*, *69*(1), 23–30. https://doi.org/10.1007/s12576-018-0606-8

Obregón, M. J., Jacobsson, A., Kirchgessner, T., Schotz, M. C., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1989). Postnatal recruitment of brown adipose tissue is induced by the cold stress experienced by the pups. An analysis of mRNA levels for thermogenin and lipoprotein lipase. *Biochem J*, *259*(2), 341–346. https://doi.org/10.1042/bj2590341

Okamatsu-Ogura, Y., Fukano, K., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., Nakamura, K., Morimatsu, M., . . . Kimura, K. (2017). Cell-cycle arrest in mature adipocytes impairs BAT development but not WAT browning, and reduces adaptive thermogenesis in mice. *Sci Rep*, *7*(1), 6648. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07206-8

Okamatsu-Ogura, Y., Fukano, K., Tsubota, A., Uozumi, A., Terao, A., Kimura, K., & Saito, M. (2013). Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One*, *8*(12), e84229. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084229

Okamatsu-Ogura, Y., Kuroda, M., Tsutsumi, R., Tsubota, A., Saito, M., Kimura, K., & Sakaue, H. (2020). UCP1-dependent and UCP1-independent metabolic changes induced by acute cold exposure in brown adipose tissue of mice. *Metabolism*, *113*, 154396. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154396

Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Nagaya, K., Tsubota, A., & Kimura, K. (2018). Brown adipocytes postnatally arise through both differentiation from progenitors and conversion from white adipocytes in Syrian hamster. *J Appl Physiol (1985)*, *124*(1), 99–108. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00622.2017

Okamatsu-Ogura, Y. & Saito, M. (2021). Brown Fat as a Regulator of Systemic Metabolism beyond Thermogenesis. *Diabetes Metab J*, *45*(6), 840–852. https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0291

Omachi, A., Ishioka, K., Uozumi, A., Kamikawa, A., Toda, C., Kimura, K., & Saito, M. (2007). Beta3-adrenoceptor agonist AJ-9677 reduces body fat in obese beagles. *Res Vet Sci*, *83*(1), 5–11. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.10.003

Park, J., Shin, S., Liu, L., Jahan, I., Ong, S. G., Xu, P., . . . Jiang, Y. (2021). Progenitor-like characteristics in a subgroup of UCP1 + cells within white adipose tissue. *Dev Cell*, *56*(7), 985–999. e984. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.02.018

Pearson, L. E., Liwanag, H. E., Hammill, M. O., & Burns, J. M. (2014). To each its own: Thermoregulatory strategy varies among neonatal polar phocids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *178*, 59–67. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.08.006

Riis-Vestergaard, M. J., Richelsen, B., Bruun, J. M., Li, W., Hansen, J. B., & Pedersen, S. B. (2020). Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, *105*(4). https://doi.org/10.1210/clinem/dgz298

Saito, M., Matsushita, M., Yoneshiro, T., & Okamatsu-Ogura, Y. (2020). Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *11*, 222. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00222

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., . . . Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, *58*(7), 1526–1531. https://doi.org/10.2337/db09-0530

Sakurai, Y., Okamatsu-Ogura, Y., Saito, M., Kimura, K., Nakao, R., Ohnuma, A., & Kobayashi, M. (2015). Brown adipose tissue expresses uncoupling protein 1 in newborn harbor seals (Phoca vitulina) [https://doi.org/10.1111/mms.12193]. *Marine Mammal Science*, *31*(2), 818–827. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mms.12193

Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., Sparks, C. A., Tang, Y., Li, H., & Guertin, D. A. (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab*, *16*(3), 348–362. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.003

Seki, T., Hosaka, K., Lim, S., Fischer, C., Honek, J., Yang, Y., . . . Cao, Y. (2016). Endothelial PDGF-CC regulates angiogenesis-dependent thermogenesis in beige fat. *Nat Commun*, *7*, 12152. https://doi.org/10.1038/ncomms12152

Sellayah, D., & Sikder, D. (2014). Orexin restores aging-related brown adipose tissue dysfunction in male mice. *Endocrinology*, *155*(2), 485–501. https://doi.org/10.1210/en.2013-1629

Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., & Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res*, *54*(8), 2214–2224. https://doi.org/10.1194/jlr.M038711

Shimizu, I., Aprahamian, T., Kikuchi, R., Shimizu, A., Papanicolaou, K. N., MacLauchlan, S., . . . Walsh, K. (2014). Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*, *124*(5), 2099–2112. https://doi.org/10.1172/jci71643

Shin, W., Okamatsu-Ogura, Y., Machida, K., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., & Kimura, K. (2017). Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice. *Obesity (Silver Spring)*, *25*(2), 417–423. https://doi.org/10.1002/oby.21727

Shin, W., Okamatsu-Ogura, Y., Matsuoka, S., Tsubota, A., & Kimura, K. (2019). Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in obese mice. *J Vet Med Sci*, *81*(6), 799–807. https://doi.org/10.1292/jvms.19-0070

Shinoda, K., Luijten, I. H., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S. B., Kim, M., . . . Kajimura, S. (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown

adipocytes. *Nat Med*, *21*(4), 389–394. https://doi.org/10.1038/nm.3819

Sun, C., Sakashita, H., Kim, J., Tang, Z., Upchurch, G. M., Yao, L., . . . Olson, L. E. (2020). Mosaic Mutant Analysis Identifies PDGFR*α*/PDGFR*β* as Negative Regulators of Adipogenesis. *Cell Stem Cell*, *26*(5), 707–721.e705. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.03.004

Sun, W., Dong, H., Becker, A. S., Dapito, D. H., Modica, S., Grandl, G., . . . Wolfrum, C. (2018). Cold-induced epigenetic programming of the sperm enhances brown adipose tissue activity in the offspring. *Nat Med*, *24*(9), 1372–1383. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0102-y

Thomas, S. A., & Palmiter, R. D. (1997). Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature*, *387*(6628), 94–97. https://doi.org/10.1038/387094a0

Tsubota, A., Okamatsu-Ogura, Y., Bariuan, J. V., Mae, J., Matsuoka, S., Nio-Kobayashi, J., & Kimura, K. (2019). Role of brown adipose tissue in body temperature control during the early postnatal period in Syrian hamsters and mice. *J Vet Med Sci*, *81*(10), 1461–1467. https://doi.org/10.1292/jvms.19-0371

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*, *19*(10), 1338–1344. https://doi.org/10.1038/nm.3324

Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., . . . Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest*, *123*(8), 3404–3408. https://doi.org/10.1172/jci67803

低温科学 81 （2023） 109–117
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 109

概日時計の温度補償性と Ca^{2+} シグナルの役割

金　尚宏[1, 2, 3]，榎木　亮介[4, 5]

2022 年 12 月 1 日受付，2023 年 1 月 16 日受理

概日時計は自律振動性，同調性，温度補償性という三つの重要な性質を持つ．概日時計の分子メカニズムの研究は，リズムに異常を示す時計遺伝子の変異体の発見から進展した．動物において，概日性の遺伝子発現リズムは転写翻訳フィードバックループによって生み出されている．この転写翻訳フィードバックループは概日性の Ca^{2+}-CaMKII シグナルの活性化によって制御されており，CaMKII は転写因子 CLOCK をリン酸化することで活性化する．概日時計の特性として，生理的な温度範囲において周期が約 24 時間に保たれる温度補償性が知られている．概日時計の周期がいかにして低温で維持されるのかは不明な点が多かったが，近年の研究から，Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体（NCX）に依存した低温で活性化する Ca^{2+} シグナルが転写翻訳フィードバックループの振動速度を調節することが分かってきた．

Temperature compensation of circadian clock and the role of Ca^{2+} signaling

Naohiro Kon[1, 2, 3] and Ryosuke Enoki[4, 5]

Three important features of the circadian clocks are autonomous oscillation, entrainment and temperature compensation. Molecular mechanisms of the clocks were clarified by the discoveries of clock genes, and the circadian rhythms are generated by transcriptional and translational feedback loops. The feedback loops are regulated by rhythmic phosphorylation of CLOCK by circadian Ca^{2+}-CaMKII signaling. In response to temperature decrease, NCX promotes Ca^{2+} influx to activate CaMKII for regulation of the feedback loop in the temperature compensation of period

連絡先
金　尚宏
〒464–8601　愛知県名古屋市千種区不老町　名古屋大学 ITbM 棟 505 室
Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464–8601, Japan.
Tel. 052–789–4070
e-mail：kon.naohiro@itbm.nagoya-u.ac.jp
榎木　亮介
〒444–8787　愛知県岡崎市明大寺町字東山 5–1
Higashiyama 5–1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444–8787, Japan.
Tel. 0564–59–5258
e-mail：enoki@nips.ac.jp
1）名古屋大学　トランスフォーマティブ生命分子研究所（ITbM）
Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464–8601, Japan.
2）名古屋大学大学院　生命農学研究科　動物科学専攻　動物統合生理学教室
Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464–8601, Japan.
3）Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE）, SunRiSE, Suntory Foundation for Life Sciences, Suntory World Research Center, 8–1–1 Seikadai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto, 619–0284, Japan
〒619–0284　京都府相楽郡精華町精華台 8–1–1　サントリーワールドリサーチセンター　サントリー生命科学財団
4）自然科学研究機構生理学研究所　バイオフォトニクス研究部門
Division of Biophotonics, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5–1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444–8787, Japan.
5）自然科学研究機構生命創成探究センター　バイオフォトニクス研究グループ
Biophotonics Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5–1, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444–8787, Japan.

length.

キーワード：概日時計，温度補償性，Ca^{2+}シグナル，CaMKII，Na^{+}/Ca^{2+}交換輸送体
Circadian clock, temperature compensation, Ca^{2+} signaling, CaMKII, Na^{+}/Ca^{2+} exchanger

1. 概日リズムと時計

動物の睡眠や覚醒，植物の光合成活性などは，環境変化を一定にした条件下でも約一日周期のリズムが観察される．これらのリズムは概日リズムと呼ばれ，英語ではサーカディアンリズム（circadian rhythm）と表される．この概日リズムを生み出しているのが概日時計という生物時計である（海老原史樹文，深田吉孝，1999；岡村均，深田吉孝，2004；海老原史樹文，吉村崇，2012）．概日時計は，動物や植物だけでなく，真菌，シアノバクテリアのような原核生物にも存在している．概日時計を持つことによって，生物は環境の周期的な変化を予測することが可能となり，生存競争で有利に働くと考えられている．概日時計の重要な特性は３つあり，一つ目は**「自律振動性」**である．恒暗条件下において，ショウジョウバエの歩行活動リズムは 24.4 時間，ハツカネズミの輪回し行動リズムでは 23.6 時間というように，約一日周期のリズムが継続する（Refinetti, 2016）．概日時計の二つ目の重要な特性は，環境サイクルとの**「同調性」**である．概日時計の位相（時刻）は，明暗や温度などの同調因子によって調節される．そのため，概日時計の周期が 24 時間より少しずれていても，環境サイクルに同調することができる．そして，概日時計の三つ目の性質は**「温度補償性」**である．温度補償性とは，季節や昼夜の寒暖に伴う温度変化に依らず，概日リズムの周期がほぼ一定に保たれる性質である．温度係数 Q_{10} は，温度が 10℃変化した際の反応速度の変化を示す指標としてよく用いられる．例えば酵素反応の場合，37℃での反応速度を 27℃での反応速度で割った値により Q_{10} を求められるが，一般的な生化学反応では Q_{10} は約２から３である．概日時計は生化学反応で構成されているにも関わらず，実際に観察される概日リズムの Q_{10} は 0.8 から 1.2 の間に保たれている．この温度補償性は，環境温度によって細胞の温度が強く影響される昆虫，植物，あるいは細菌においてとりわけ重要である．本性質は 1950 年代まで，概日時計の周期の温度非依存性と呼ばれていた（Pittendrigh, 1954）．しかし，1957 年に渦鞭毛藻ゴニオラックスの生物発光リズムの研究において，温度を下げるとリズム周期はやや短くなる（Q_{10} が１よりも小さくなる）という過補償現象（overcompensation）が見出された（Hastings & Sweeney, 1957）．この観察により，概日時計の周期は温度に非依存というわけではなく，むしろ積極的に周期を補償するメカニズムが存在すると考えられるようになり，温度補償性という呼び方が定着した．温度補償性は内温動物の概日時計にも観察され，哺乳類の培養細胞の転写リズムも生理的な温度範囲でほぼ一定の周期に保たれている．

2. 哺乳類の概日時計の存在場所

哺乳類の概日時計は睡眠，覚醒，あるいは摂食などを強く制御する一方で，絶食，断眠，あるいは内分泌器官の除去によって大きな影響を受けない（Richter, 1965）．1972 年，外科的な切除実験から，脳の視床下部領域に存在する視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus）に概日時計の中枢が存在することが分かった（Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972）．視交叉上核は約２万個の神経細胞から構成されるネットワークを形成しており，個々の細胞レベルで代謝や活動電位の概日リズムが観察される．この視交叉上核の中枢時計は全身の組織に存在する末梢時計の位相を調節している（Yamazaki et al., 2000）．そして，時計遺伝子の発現リズムはいくつかの不死化した培養細胞株においても観察されることから（Balsalobre et al., 1998），生体外という非生理的な条件下においても概日時計は機能することが分かる．末梢細胞のリズム位相を調節する代表的な因子としては，副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドの一種であるコルチゾールが知られており（Balsalobre et al., 2000a），ヒトの場合，血中コルチゾール濃度は明け方にピークを持つ概日リズムを示す．その他，上皮成長因子，線維芽細胞増殖因子，エンドセリン，トランスフォーミング増殖因子ベータやインスリンなど，多くの因子が末梢時計の同調に関わっている（Balsalobre et al., 2000b; Kon et al., 2008）．このような末梢組織とは異なり，視交叉上核の組織を *in vitro* で培養した場合では数十日に渡って遺伝子発現リズムが維持される．これは，視交叉上核の個々の神経細胞はシナプス結合や神経ペプチドを介して同調しており，単離した培養条件下でも脱同調が起こりにくいためである．このような細胞間カップリングによる個々の神経細胞のリズム同調は，中枢時計の安定な高振幅リズムを生み出す上で重要である．

3. リズム変異体と転写翻訳フィードバックループ

概日リズムの形成に関わる分子メカニズムは，いくつかの生物種においてリズム変異体が同定されたことにより飛躍的に理解が進んだ．1971 年，Konopka と Benzer は最初のリズム変異体であるショウジョウバエ *period*（*per*）変異体を報告した（Konopka & Benzer, 1971）．1973 年にはアカパンカビの胞子形成リズムに異常を示す *frequency*（*frq*）変異体が報告され，1988 年には哺乳類におけるハムスターの *tau* 変異体，1994 年にはマウスの *Clock* 変異体が報告された（海老原史樹文，深田吉孝，1999；岡村均，深田吉孝，2004；海老原史樹文，吉村崇，2012.）．そして，1994 年には光合成細菌のシアノバクテリアにおいて *kai* 変異体群が報告された．1984 年に米国の 2 つの独立のグループからショウジョウバエの *per* 遺伝子がクローニングされ，それに続いて哺乳類，植物，真菌，および細菌で時計遺伝子が続々と明らかになった．各生物種における時計遺伝子を比較すると，動物，植物，真菌，および細菌の時計遺伝子の配列相同性は限定的であることが分かった．そのため，これらの生物系統において時計遺伝子は独立に進化したと考えられている．しかし，いずれの種においても時計遺伝子は転写翻訳フィードバックループを形成し，遺伝子発現の概日リズムを生み出すという共通点を持つことが分かった．そして 2017 年，ショウジョウバエ *per* 遺伝子の報告を行った Jeffrey Hall，Michael Rosbash，Michael Young の 3 氏に，ノーベル生理学・医学賞が授与された．

哺乳類の転写翻訳フィードバックループにおいては，CLOCK と BMAL1 が転写活性化因子として機能する．これらのタンパク質には DNA 結合モチーフである bHLH（basic helix-loop-helix）ドメインと PAS ドメインが存在する．PAS ドメインとは，PER タンパク質，ダイオキシン受容体 AHR とヘテロダイマーを形成する ARNT タンパク質，および発生に重要な転写因子 SIM に共通して見られるドメインであり，タンパク質間の相互作用に関わる．CLOCK と BMAL1 は PAS ドメインを介してヘテロ二量体を形成し，*Period*（*Per*）や *Cryptochrome*（*Cry*）遺伝子の転写制御領域に存在する DNA シスエレメント（E-box）に結合して転写を活性化する（図 1）．転写・翻訳された PER タンパク質は CRY タンパク質と複合体を形成して核内へ移行し，CLOCK と BMAL1 による *Per*・*Cry* 遺伝子の転写活性化を阻害する．このような転写翻訳フィードバックループにより，E-box を介した *Per*・*Cry* 遺伝子の発現は約一日周期の増減リズムを示す．*Clock* 変異マウス，*Bmal1* 欠損マウス，*Per1* と *Per2* の二重欠損マウス，*Cry1* と *Cry2* の二重欠損マウスは行動リズムおよび遺伝子発現リズムがほとんど消失することから，これらの因子は哺乳類の転写翻訳フィードバックループを形成する中心的な因子である．さらに，このコアループと連動するサブループが知られている．*Bmal1* 遺伝子などの転写制御領域には RORE（ROR/REV-ERB response element）が存在する．この RORE 配列に転写活性化因子 ROR と転写抑制因子 REV-ERB が拮抗的に結合し，*Bmal1* 遺伝子の転写リズムが生み出されると考えられている．このようなサブループの存在により，遺伝子ごとに一日のさまざまな時刻に発現ピークを示す転写リズムが生み出されている．

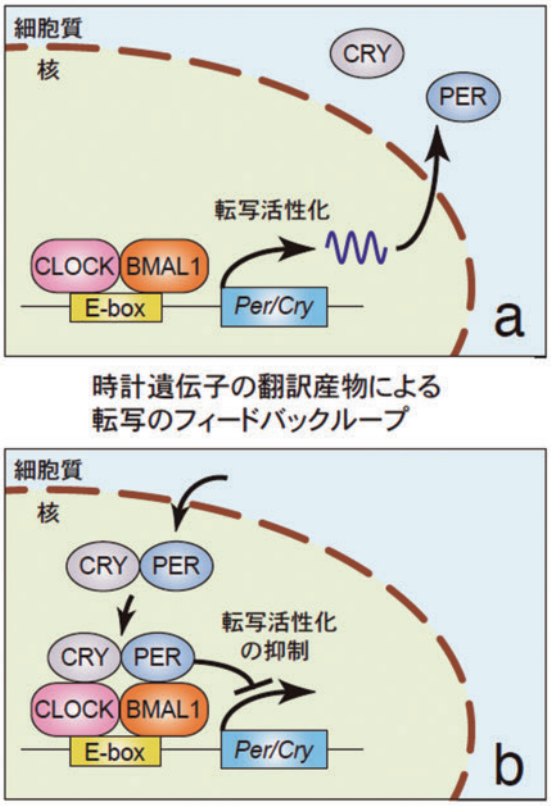


図 1：概日リズムを生み出す転写翻訳フィードバックループ
（a）bHLH 型転写因子である CLOCK と BMAL1 はヘテロ二量体を形成し，E-box 配列に結合して *Per* 遺伝子や *Cry* 遺伝子の転写を活性化する．（b）転写・翻訳された PER・CRY タンパク質は核に移行し，CLOCK-BMAL1 複合体による転写活性化を抑制する．この転写翻訳フィードバックループが約 24 時間の周期で繰り返し，時計遺伝子を含む多くの遺伝子群の概日性の発現リズムを生み出す．本図は先行文献より改変して使用した（金　尚宏，深田吉孝　2019）．

哺乳類の概日時計における翻訳後修飾の重要性は，ハムスターの行動リズム周期が大きく変化する自然発生変異 *tau* の責任遺伝子の同定から明らかとなった．ハムスターは恒暗条件下で約 24 時間の自由継続周期を示すが，

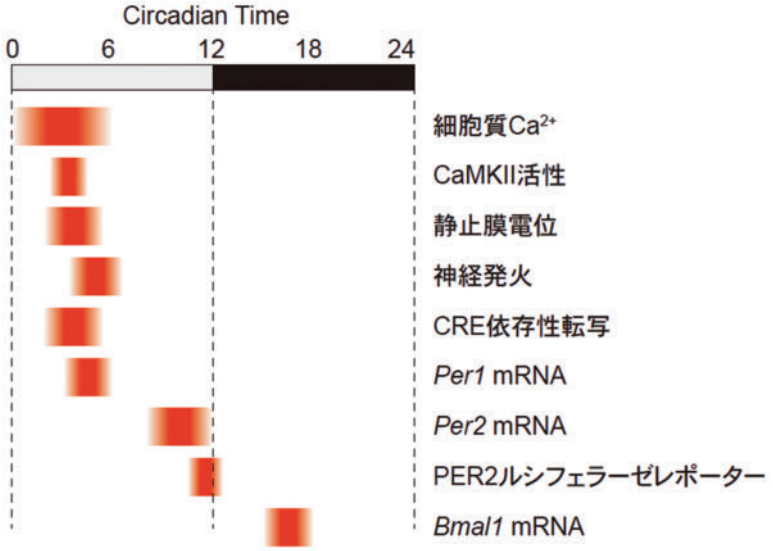


図 2：視交叉上核における各種リズムのピーク位相
各種リズムのピーク位相を赤いボックスにて示す．細胞内 Ca^{2+} リズムのピーク位相は主観的明期の前半に観察され，それに続いて CaMKII の自己リン酸化リズム，Ca^{2+}/cAMP 応答配列（CRE）に依存した転写リズム，E-box 配列に依存した転写リズムのピークが観察される．

tau 変異はヘテロ接合体で約 22 時間，ホモ接合体で約 20 時間というリズムの短周期化を引き起こす．この *tau* 変異の表現型は Casein Kinase I（CKI）ε の遺伝子変異に起因し，本変異によってキナーゼ活性が変化する．また，ヒトの家族性睡眠相前進症候群を引き起こす変異として hPER2 の Ser662Gly 変異が同定された（Toh et al., 2001）．この点変異は hPER2 の CKIε との結合部位に存在する．試験管内におけるリン酸化アッセイから，CKIε は PER2 をリン酸化することが示された．CKIε による PER2 のリン酸化はユビキチンリガーゼ複合体 SCF-β-TrCP により認識されてユビキチン化され，プロテアソームにより分解される．

転写翻訳フィードバックループは多くの真核生物で共通したリズム生成機構だが，この機構が自律振動体を形成できるかは証明されていない．原核生物であるシアノバクテリアにおいては，転写翻訳フィードバックループではなく，時計タンパク質 KaiA，KaiB，KaiC の複合体が自律振動体を形成することが証明された．KaiC タンパク質は 6 量体を形成し，自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を持つ（Cohen & Golden, 2015）．概日リズムの位相は KaiC の Ser431 と Thr432 という 2 つのアミノ酸のリン酸化状態によって決定される．主観的昼（文末の用語説明 1 参照）に両アミノ酸は脱リン酸化状態となり，KaiA は KaiC に結合する．KaiA は KaiC のリン酸化を促進することで，KaiC と KaiB との結合を促進する．一方で，KaiB は KaiA と KaiC との結合を阻害し，KaiC の脱リン酸化を促進する．その結果，KaiC にはリン酸化リズムが生まれる．精製した KaiA，KaiB および KaiC タンパク質を ATP と共に試験管内で混合することにより，KaiC のリン酸化リズムを再構成できることが示されている（Nakajima et al., 2005）．

4. Ca^{2+} による概日リズムの制御

哺乳類の視交叉上核において，細胞内の Ca^{2+} レベルは概日リズムを示す．Ca^{2+} 指示薬である fura-2-AM により細胞内 Ca^{2+} レベルを定量すると，恒暗条件下で動物にとって昼に当たる時刻（主観的昼）に採取したラットの視交叉上核の神経細胞では，主観的夜に採取した細胞と比べて Ca^{2+} 濃度が高いことが示された（Colwell 2000）．この結果と一致して，電気生理学的な解析によって，昼間（ZT4–8，用語説明 2 参照）に採取されたラットの視交叉上核の細胞は，夜間（ZT13–20）に採取されたものと比べて，高振幅の Ca^{2+} 電流が観察される（Pennartz et al., 2002）．池田らは，組織培養した視交叉上核の神経細胞においても細胞質 Ca^{2+} レベルは明瞭な概日リズムを示すことを報告し，細胞内 Ca^{2+} は自律的に概日振動していることを明らかにした（Ikeda et al., 2003）．Ca^{2+} リズムのピークはおよそ CT1–6（用語説明 2 参照）に観察され，これは視交叉上核の発火頻度の概日リズムと比べて 2 から 7 時間ほど先行している（Ikeda et al., 2003; Enoki et al., 2017）（図 2）．この Ca^{2+} リズム

は視交叉上核の領域内において，背側領域に比して腹側領域の方がより高振幅のリズムを示し，ピーク位相が遅れている（Enoki et al., 2012）．この視交叉上核内での領域ごとのリズムのタイミングの差異は，PER2 タンパク質の発現リズムにも観察されることから，視交叉上核内では分子レベルでリズム振幅や位相に領域特異性が存在することが分かる（Enoki et al., 2017）．視交叉上核における Ca^{2+} リズムの振幅の見積もりは，実験条件によって見積もり値に差はあるものの，いくつかの報告で行われている（Harvey et al., 2020）．一例を挙げると，遺伝子コード型 Ca^{2+} センサーである Yellow cameleon 3.60 を用いた解析の場合，Ca^{2+} リズムのトラフおよびピーク値はそれぞれ，約 85 nM および約 120 nM であった（Enoki et al., 2012）．重要なことに，視交叉上核の単一の神経細胞を他の神経細胞やグリア細胞との物理的な接触が無い条件下で培養した場合でも，概日性 Ca^{2+} リズムは観察される（Hirata et al., 2019）．また，視交叉上核においては静止膜電位にも概日リズムが観察され，主観的昼にピークを示す（Enoki et al., 2017）．興味深いことに，この静止膜電位のリズムには Ca^{2+} や PER2 で観察されるような視交叉上核内の領域特異性は観察されない．そのため，静止膜電位は視交叉上核内で均一となるように制御されていると考えられる．

培養した視交叉上核の細胞において，培養液中の Ca^{2+} イオンを欠乏させると，神経の発火リズムやグルコースの取り込みリズムが消失する（Shibata et al., 1984; Shibata et al., 1987）．また，Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルビンジン D28K の欠損マウスにおいて，自発行動の概日リズムの自律性および光同調性が障害されることから（Kriegsfeld et al., 2008），Ca^{2+} シグナルは視交叉上核における概日リズムの生成に重要であると考えられていた．Lundkvist らは，細胞内 Ca^{2+} イオンを BAPTA-AM によってキレートすると，*Per1* や PER2 ルシフェラーゼレポーターによる転写リズムが消失することを報告した（Lundkvist et al., 2005）．さらに，電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤を視交叉上核の培養スライスに投与すると，*Per1* ルシフェラーゼレポーターによる転写リズムは減衰する．また，人工受容体である DREADD システムによって Gq-Ca^{2+} シグナルを人為的に制御すると，視交叉上核の時計遺伝子の発現リズムが影響されることが示された（Brancaccio et al., 2013）．これらの結果より，細胞内 Ca^{2+} は転写翻訳フィードバックループの振動形成に深く関わっていることが分かったが，どういったシグナル分子が転写翻訳フィードバックループを制御するのかは明らかになっていなかった．

5. Ca^{2+} シグナルは CaMKII よって転写翻訳フィードバックループに伝達される

金らは，Rat-1 線維芽細胞を用いて概日時計の発振メカニズムを解析している過程で，Ca^{2+} 依存性のリン酸化酵素の活性が，転写翻訳フィードバックループの振動に必須であることを見出した（Kon et al., 2014; Kon et al., 2015）．*Bmal1* ルシフェラーゼレポーターを発現した Rat-1 線維芽細胞に CaMKII 阻害剤の KN-93 を投与すると，用量依存的に転写リズムの振幅は減衰した．CaMKII は細胞内 Ca^{2+} の上昇によって活性化するタンパク質リン酸化酵素である．細胞内で上昇した Ca^{2+} はカルモジュリンと結合し，Ca^{2+}–カルモジュリン複合体は CaMKII に結合する．これにより，CaMKII は自己リン酸化を介して活性化型となり，種々のタンパク質基質をリン酸化する．哺乳類において，CaMKII は CaMKIIα, CaMKIIβ, CaMKIIγ, CaMKIIδ という 4 つの遺伝子にコードされており，CaMKIIα と CaMKIIβ は脳に強く発現し，CaMKIIγ と CaMKIIδ は様々な組織に広範に発現する．NIH3T3 細胞において，CaMKIIγ および CaMKIIδ を siRNA にてノックダウンした場合，*Bmal1* ルシフェラーゼレポーターによる発光リズムの振幅が大幅に低下したことから，CaMKII は転写リズムの生成に必要であることが分かった（Kon et al., 2014）．また，Rat-1 細胞において CaMKII 阻害剤を投与すると，E-box により制御されている *Per1*，*Per2* などの遺伝子の発現は強く抑制される一方，*Bmal1* など RORE によって制御されている遺伝子は発現上昇した状態で転写リズムが停止する．そして生化学的な解析から，CaMKII は CLOCK のリン酸化を促進することで CLOCK と BMAL1 のヘテロ二両体の形成を促進し，E-box を介して遺伝子の転写を活性化することが分かった（図 3）．

視交叉上核において，Ca^{2+} は CT1–6 にピークを示し，CaMKII の自己リン酸化のピークは CT4 に観察される（Agostino et al., 2004）．この CaMKII の活性化ピークから少し遅れて *Per1* 遺伝子が発現ピークを示す（Ueda et al., 2005）．末梢組織である肺においても，CaMKII の自己リン酸化リズムと時計遺伝子の発現リズムはともに CT10–14 においてピークを示す（Kon et al., 2015）．このことから，視交叉上核だけでなく，末梢の組織においても CaMKII の活性化リズムと E-box 依存的な転写リズムはほぼ同じ位相でピークを示すことが分かった．視交叉上核に発現するアイソフォームの一つである CaMKIIα に関して，キナーゼ失活変異（ノックイン）マウスの輪回し行動リズムを解析したところ，リズム周期

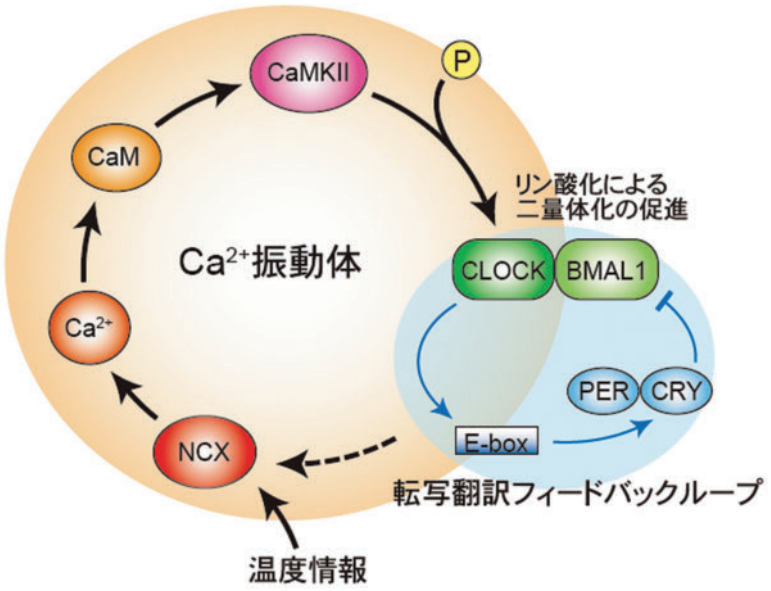


図 3：哺乳類の概日時計の分子メカニズム
概日性の Ca^{2+} リズムは CaMKII の活性リズムを生み出す．CaMKII は CLOCK をリン酸化して CLOCK と BMAL1 の結合を促す．活性化した CLOCK-BMAL1 によって *Per* や *Cry* の遺伝子発現が亢進する．NCX は温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} 流入を促進し，CaMKII を活性化することで転写翻訳フィードバックループを加速し，転写リズムの温度補償性を担う．本図は先行文献より改変して使用した（Kon et al. 2014; Kon et al. 2021）．

の長周期化と一過的なリズム消失が観察された（Kon et al., 2014）．視交叉上核の急性培養スライスを用いた PER2 ルシフェラーゼレポーターによるイメージング解析の結果，CaMKII 活性は単一の細胞レベルのリズム振幅の維持に加え，細胞間のカップリングにも重要な因子であることが分かった．

6. Ca^{2+} による転写リズムの温度補償性の制御

転写リズムを生み出す転写翻訳フィードバックループは，遺伝子の転写や翻訳，タンパク質の核移行など，温度感受性の反応が多く含まれている．そのため私たちは，転写翻訳フィードバックループの温度補償性には，温度に応じて機能する細胞内シグナルが存在するのではないかと着想し，温度補償性に関わる分子の探索を試みた．Rat-1 線維芽細胞の転写リズムを *Bmal1* ルシフェラーゼレポーターにより測定した際には，37℃での転写リズムの周期は 23.3 時間に対し，32℃では 21.2 時間であることが分かった．そのため，培養細胞においても概日リズム周期の過補償現象が観察されることが分かった（Kon et al., 2021）．この細胞実験系を用いて，転写リズムの温度補償性に影響を及ぼす低分子化合物をスクリーニングした．その結果，CaMKII 阻害剤 KN-93，あるいは Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体の阻害剤である KB-R7943 や SEA0400 の存在下では，転写リズムの温度補償性が大きく阻害されることが分かった．本結果から Ca^{2+} シグナルが温度補償性に関わることが示唆されたため，筆者らは Ca^{2+} シグナルと温度の関係に関して文献を検索した．そして，Rapid cold hardening（RCH）という低温耐性の獲得機構に着目した．ニクバエの一種である *Sarcophaga crassipalpis* では，通常の飼育温度である 25℃の状態から，−10℃で 2 時間飼育すると，80％以上の個体が死亡する（Lee et al., 1987）．しかし，25℃の状態から，0℃で 1 時間飼育した後に，−10℃に暴露すると，死亡個体は 20％以下へと大きく減少する．この数分から数時間で獲得される低温耐性は RCH と呼ばれ，Ca^{2+} や CaMKII が関わることが知られていた（Teets et al., 2013）．そこで私たちは，哺乳類の細胞においても温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇し，CaMKII が活性化することで概日時計の温度補償性を担っているのではないかと着想した．

Ca^{2+} 指示薬である Fluo-4 を用いて，マウス由来線維芽細胞である NIH3T3 細胞における Ca^{2+} レベルを定量イメージングしたところ，37℃から 27℃への温度低下に伴い，Fluo-4 の蛍光レベルの上昇が観察された．この温度低下による蛍光シグナルの上昇は，NCX 阻害剤である KB-R7943 あるいは SEA0400 により阻害されたことから，NCX は温度低下に応じて細胞内 Ca^{2+} レベルを上

昇させることが明らかとなった．またこの際，細胞内のCaMKII活性も上昇することが分かった．さらなる解析から，細胞内CaMKII活性の上昇は転写フィードバックループの振動速度を早めることが分かった．そのため，低温で活性化するCa^{2+}-CaMKIIによって転写フィードバックループの振動速度が加速されることで，温度補償性が成立することが示唆された（図3）．

次に私たちは，低温性Ca^{2+}シグナルによるタンパク質リン酸化の亢進が昆虫や植物の組織でも観察されるのかを調べた．外気温を25℃から4℃に変化させた場合，ショウジョウバエの頭部組織ライセートにおいてCaMKII活性の上昇が確認された．また，シロイヌナズナの地上部組織を用いたライセートにおいても，22℃から4℃に変化させた際に，CaMKIIの基質ペプチドであるsyntide-2に対するリン酸化活性の上昇が観察された．シロイヌナズナにおいてCaMKIIは存在しないが，Ca^{2+}やカルモジュリン依存性のリン酸化酵素は多く存在している（Liese & Romeis, 2013）．そのため，植物における低温性Ca^{2+}シグナルを媒介するリン酸化酵素の発見は，概日リズムや低温応答の分子機構の理解に貢献すると考えられる．

哺乳類の視交叉上核におけるCa^{2+}シグナルの温度応答を解析するため，光イメージング実験を行った．視交叉上核の培養スライスにおいて，35℃において観察された明瞭な概日Ca^{2+}リズムは，28℃においても継続したが，この際，リズムのピークおよびトラフはともに上昇することが分かった．この結果から，環境温度の変化は，細胞内のCa^{2+}レベルを全体的に上昇させる形で細胞内へ情報伝達されることが分かった．

低温性Ca^{2+}シグナルは進化的にどの生物まで保存されているのだろうか？　シアノバクテリアにおいても，環境温度の低下は細胞内Ca^{2+}レベルを上昇させることが知られている（Torrecilla et al., 2003）．そのため，低温性Ca^{2+}シグナルはバクテリアのような原核生物においても保存された低温応答であると考えられる．また，低温性Ca^{2+}シグナルを媒介するNCXは全ての真核生物と原核生物に存在すると言われている（Emery et al., 2012）．そこで，シアノバクテリアにおいてNCXをコードする*yrbG*遺伝子のノックアウト株を作製し，概日リズムの温度補償性を解析した．その結果，野生型におけるP_{KaiBC}::luxABレポーターの発光リズムのQ_{10}値は1.2であったのに対し，*yrbG*欠損株では1.5となり，転写リズムの温度補償が阻害されることが明らかとなった．これらの結果から，NCXに依存した低温性Ca^{2+}シグナルは，生物界を超えて概日リズムの温度補償性に関わることが明らかとなった．すなわち，真核生物と原核生物に保存された初めての時計因子として，NCXの存在が明らかとなった（図4）．

7. 今後の展開

転写フィードバックループを構成する転写関連因子は各生物界で異なるため，これまで，概日時計機構そのものが生物界で独立進化したと考えられていた．しかし最近の私たちの研究から，真核生物と原核生物に保存された初めての時計因子としてNCXの存在が明らかとなったため，Ca^{2+}に基づいた祖先的な概日時計が共通祖先に存在していたことが示唆された．NCXの機能保存性を考慮すると，NCXによる低温性Ca^{2+}シグナルが祖先的な概日時計の形成に寄与したとも考えられる．もしかしたら，日内の環境変化に伴う温度サイクルが低温性Ca^{2+}シグナルのサイクルを生み出し，起源的な時計を形成したのかもしれない．今後の研究によってNCX依存的なCa^{2+}シグナルの理解が進めば，各生物界における概日時計の進化や，起源が明らかになると期待される．

用語説明

1．主観的昼・主観的夜

24時間周期の明暗環境サイクルでは，昼間（明期）と夜間（暗期）に応じて動物の行動や生理は変化する．一方，環境変化の無い恒常的な環境（例えば恒常的な暗条件）でも約24時間周期で昼と夜にみられる概日リズムが現れる．このような概日リズムの自由継続条件において，昼間に相当する生理現象がみられる時間帯を主観的昼と呼び，夜間に相当する生理現象がみられる時間帯を主観的夜という．一定の環境条件においても生物が「主観的に」昼と判断している時間帯と，「主観的に」夜と判断している時間帯があるという考え方に基づく用語である．

2．Zeitgeber Time（ZT）・Circadian time（CT）

Zeitgeber（ドイツ語）は英語のTime giverを表し，環境サイクルに合わせた時間制を示す．例えば，明期12時間，暗期12時間という24時間の明暗サイクルで動物を飼育した場合，明周期の開始時刻をZeitgeber Time（ZT0），暗周期の開始時刻をZT12とする．

一方でCircadian time（CT）は，身の回りに存在する機械式の時計ではなく，生物の概日リズムに基づいた時間制である．概日リズムの周期は正確には24時間ではないが，この周期を24時間に見立て，24等分して用いる．例えば周期が23時間の概日リズムの場合には，1 Circadian Timeは，23/24時間で57.5分に相当する．普通は，主観的昼の始まりをCT0とする．この位相は，生物が24時間の明暗サイクルに同調しているとき，明期の開始（ZT0）に対応する．

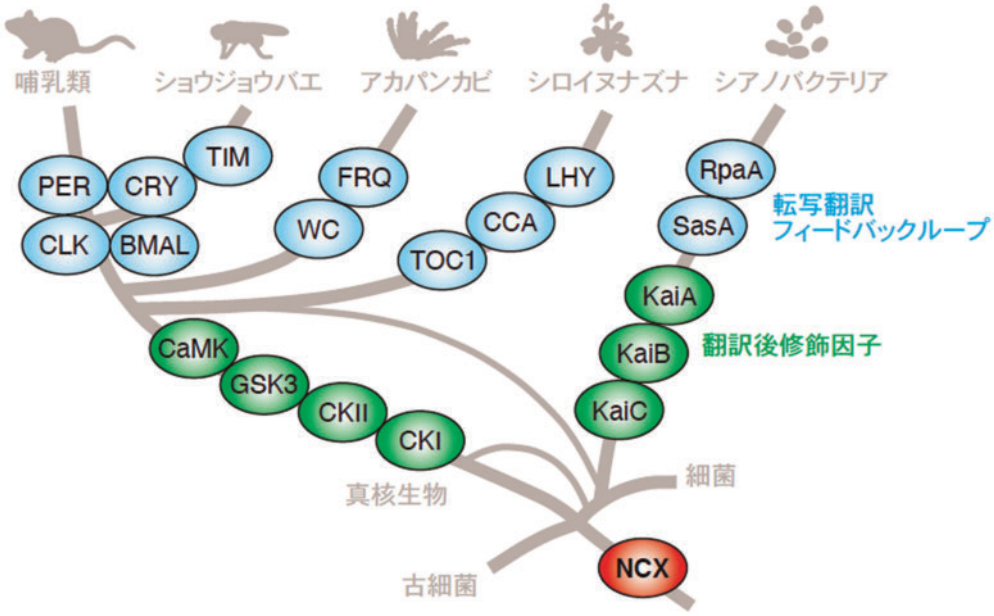


図 4：各生物界における時計遺伝子と進化的保存性
転写リズムを生み出す時計遺伝子は動物界，真菌界，植物界，細菌界で配列の相同性が限定的であることから，独立進化したと考えられている．真核生物においては，カゼインキナーゼ 1（CK1）やカゼインキナーゼ 2（CK2），グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3（GSK3）などのリン酸化酵素は周期制御という観点で役割が保存されている．シアノバクテリアにおいては KaiA，KaiB，KaiC のタンパク質複合体が自律振動体を形成する．NCX は現生の全ての生物種に保存されていることから，全生命の共通祖先から存在した遺伝子と考えられている．本図は先行文献より改変して使用した（Kon et al. 2021）．

引用文献

海老原史樹文，深田吉孝（1999）生物時計の分子生物学．シュプリンガー・フェアラーク，東京．

岡村均，深田吉孝（2004）時計遺伝子の分子生物学．シュプリンガー・フェアラーク，東京．

海老原史樹文，吉村崇（2012）時間生物学．化学同人．

金尚宏，深田吉孝（2019）生物時計と体のリズム．学術の動向．24，8-19

Agostino, P. V., Ferreyra, G. A., Murad, A. D., Watanabe, Y., Golombek, D. A. (2004). Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. Neurochem Int., **44**, 617–625.

Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. Science, **289**, 2344–2347.

Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell, **93**, 929–937.

Balsalobre, A., Marcacci, L., Schibler, U. (2000). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. Curr Biol., **10**, 1291–1294.

Brancaccio, M., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Loudon, A. S. I., Hastings, M. H. (2013). A Gq-Ca^{2+} axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. Neuron, 78, 714–728.

Cohen, S. E., Golden, S. S. (2015). Circadian Rhythms in Cyanobacteria. Microbiol Mol Biol Rev., **79**, 373–385.

Colwell, C. S. (2000). Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. Eur J Neurosci., **12**, 571–576.

Emery, L. Whelan, S., Hirschi, K. D., Pittman, J. K. (2012). Protein phylogenetic analysis of Ca^{2+}/cation antiporters and insights into their evolution in plants. Front. Plant Sci., **3**, 1.

Enoki, R., Kuroda, S., Ono, D., Hasan, M. T., Ueda, T., Honma, S., Honma, K. (2012). Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci USA., **109**, 21498–21503.

Enoki, R., Oda, Y., Mieda, M., Ono, D., Honma, S., Honma, K. (2017). Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl Acad Sci USA., **114**, E2476-E2485.

Enoki, R., Ono, D., Kuroda, S., Honma, S., Honma, K. (2017). Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Sci Rep., **7**, 41733.

Harvey, J. R. M., Plante, A. E., Meredith, A. L. (2020). Ion Channels Controlling Circadian Rhythms in

Suprachiasmatic Nucleus Excitability. Physiol Rev., **100**, 1415–1454.

Hastings, J. W., Sweeney, B. M. (1957). On the mechanism of temperature independence in a biological clock. Proc Natl Acad Sci USA., **43**, 804–811.

Hirata, Y., Enoki, R., Kuribayashi-Shigetomi, K., Oda, Y., Honma, S., Honma, K. (2019). Circadian rhythms in Per1, PER2 and Ca^{2+} of a solitary SCN neuron cultured on a microisland. Sci Rep., **9**, 18271.

Ikeda, M., Sugiyama, T., Wallace, C. S., Gompf, H. S., Yoshioka, T., Miyawaki, A., Allen, C. N. (2003). Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in single suprachiasmatic nucleus neurons. Neuron, **38**, 253–263.

Kon, N., Hirota, T., Kawamoto, T., Kato, Y., Tsubota, T., Fukada, Y. (2008). Activation of TGF-beta/activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of Dec1 transcripts. Nat Cell Biol., **10**, 1463–1469.

Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., Fukada, Y. (2015). Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations. Commun Integr Biol., **8**, e982405.

Kon, N., Wang, H., Kato, Y. S., Uemoto, K., Kawamoto, N., Kawasaki, K., Enoki, R., Kurosawa, G., Nakane, T., Sugiyama, Y., Tagashira, H., Endo, M., Iwasaki, H., Iwamoto, T., Kume, K., Fukada, Y. (2021). Na^{+}/Ca^{2+} exchanger mediates cold Ca^{2+} signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms. Science Adv., 7, eabe8132.

Kon, N., Enoki, R., Wang, H., Fukada, Y. Roles of Ca^{2+} Signaling in Molecular Clocks. Circadian clocks, In press

Kon, N., Yoshikawa, T., Honma, S., Yamagata, Y., Yoshitane, H., Shimizu, K., Sugiyama, Y., Hara, C., Kameshita, I., Honma, K., Fukada, Y. (2014). CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. Genes Dev., **28**, 1101–1110.

Konopka, R. J., Benzer, S. (1971). Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2112–2116.

Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Yan, L., Witkovsky, P., Lesauter, J., Hamada, T., Silver, R. (2008). Targeted mutation of the calbindin D28K gene disrupts circadian rhythmicity and entrainment. Eur J Neurosci., 27, 2907–2921.

Lee, J. R. E., Chen, C. P., Denlinger, D. L. (1987). A rapid cold-hardening process in insects. Science, 238, 1415–1417.

Liese, A., Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). Biochim Biophys Acta, **1833**, 1582–1589.

Lundkvist, G. B., Kwak, Y., Davis, E. K., Tei, H., Block, G. D. (2005). A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. J Neurosci., 25, 7682–7686.

Moore, R. Y., Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Res., **42**, 201–206.

Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. Science, **308**, 414–415.

Pennartz, C. M. A., de Jeu, M. T. G., Bos, N. P. A., Schaap, J., Geurtsen, A. M. S. (2002). Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. Nature, 416, 286–290.

Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA., **40**, 1018–1029.

Refinetti, R. (2016). Circadian Physiology, 3rd edition. CRC Press.

Richter C. P. (1965). Biological Clocks in Medicine and Psychiatry. Charles C. Thomas, Springfield.

Shibata, S., Newman, G. C., Moore R. Y. (1987). Effects of calcium ions on glucose utilization in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. Brain Res., 426, 332–338.

Shibata, S., Shiratsuchi, A., Liou, S. Y., Ueki, S. (1984). The role of calcium ions in circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus neuron activity in rat hypothalamic slices. Neurosci Lett., 52, 181–184.

Stephan, F. K., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc Natl Acad Sci USA., **69**, 1583–1586.

Teets, N. M., Yi, S. X., Lee J. R. E., Denlinger, D. L. (2013). Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. Proc Natl Acad Sci USA., **110**, 9154–9159.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptácek, L. J., Fu, Y. H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. Science, **291**, 1040–1043.

Torrecilla, F. Leganés, I. Bonilla, F. Fernández-Piñas. (2000). Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria. Plant Physiol., **123**, 161–176.

Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. Nat Genet., **37**, 187–192.

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science, **288**, 682–685.

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

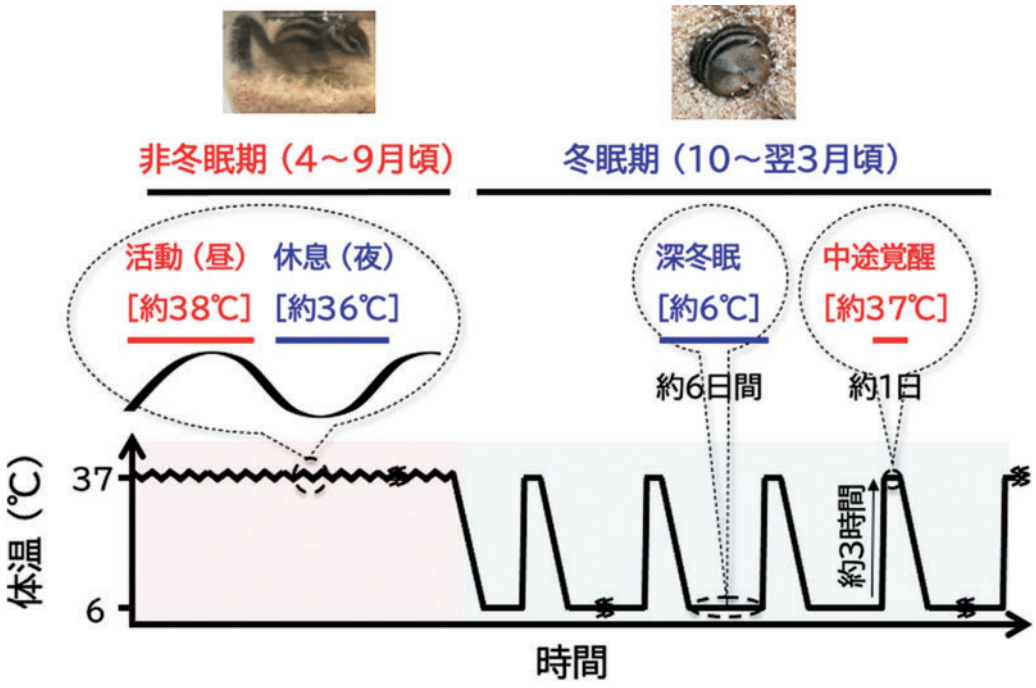


図1：シマリスの非冬眠期と冬眠期の体温変動．非冬眠期は外気温約 23℃，明暗 12 時間サイクルで飼育した場合．冬眠期は外気温約 5℃，恒暗環境で飼育した場合．冬眠期には，約 6 日間の約 6℃の体温での深冬眠と，約 37℃にまで体温を上昇させる約 1 日の中途覚醒を繰り返す．深冬眠からの中途覚醒では，体温は約 6℃から 3 時間程度で約 37℃にまで上昇する．図の体温は，直腸体温と深部体温をそれぞれプローブ（エー・アンド・デイ社）および 1ch 体温測定テレメトリーシステム（スターメディカル社）を用いて測定した値をもとに作図している．Tsukamoto et al.（2019）をもとに引用改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

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，プレーリードッグ属に含まれている（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

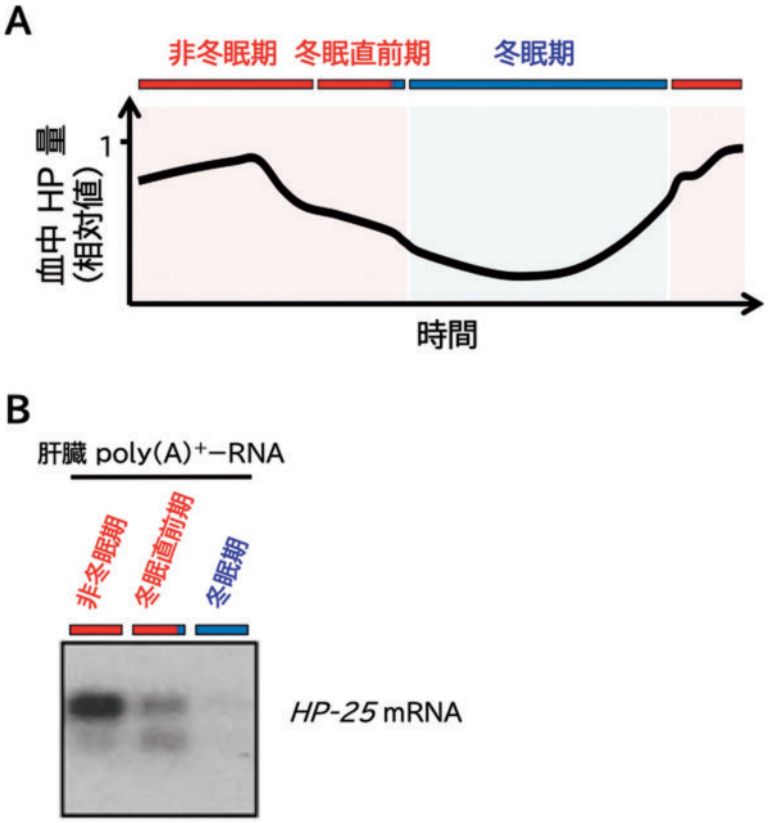


図 2：（A）シマリス血中における冬眠関連タンパク質 HP 複合体の量の変動．最大量を 1 とした相対値で示してある．（B）非冬眠期，非冬眠期の冬眠直前期，および冬眠期のシマリス肝臓から調製した poly（A）$^{+}$-RNA を用いた *HP-25* mRNA のノーザンブロット解析．Kondo et al.（2006）をもとに引用改変．

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

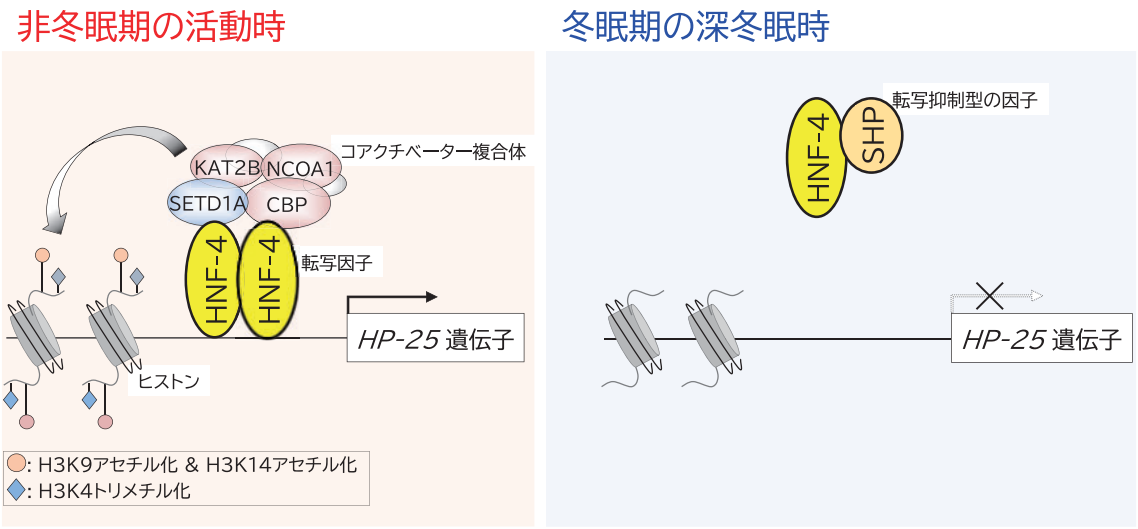


図 3：シマリス *HP-25* 遺伝子の非冬眠期と冬眠期における発現制御機構．非冬眠期の活動時では，*HP-25* 遺伝子は，プロモーター領域に転写因子 HNF-4 が結合し，コアクチベーター複合体がリクルートされ，転写活性化に関わるヒストン修飾が増加し，転写が活性化されている．一方，冬眠期の深冬眠時では，HNF-4 は転写抑制型の因子 SHP と相互作用することでプロモーター領域への結合量が低下し，コアクチベーター複合体も解離し，転写活性化に関わるヒストン修飾の量も減少することで，転写が抑制されている．H3K4，K9，K14：ヒストン H3 の 4 番目，9 番目，14 番目のリシン残基，KAT2B：Lysine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

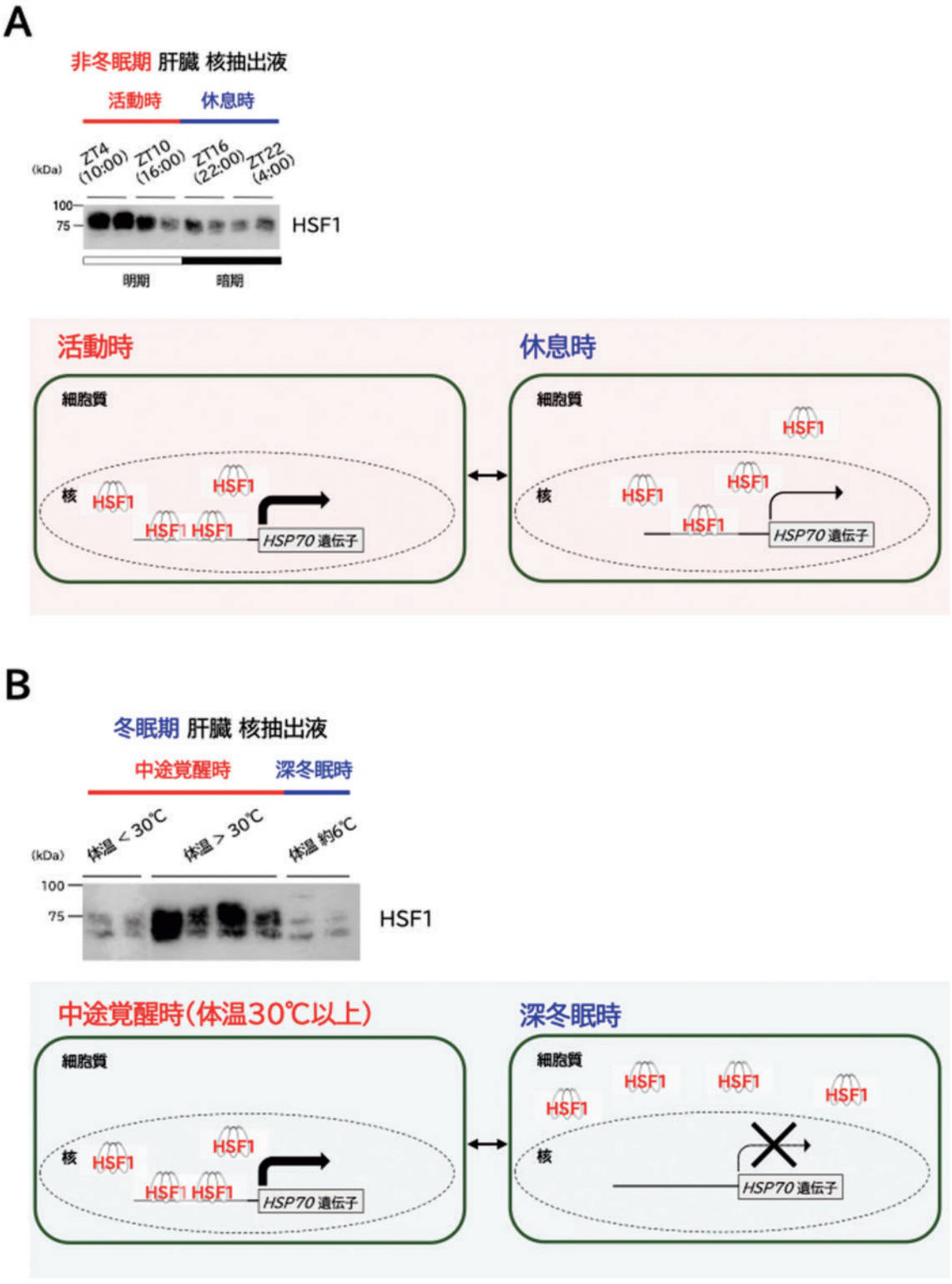


図 4：(A) 非冬眠期の各時間帯のシマリス 2 個体ずつのシマリスの肝臓核抽出液を用いた HSF1 のウエスタンブロット解析（上）．非冬眠期のシマリス *Hsp70* 遺伝子の HSF1 による発現制御機構（下）．非冬眠期では，HSF1 は常に核に存在するが，活動時の体温上昇に伴い活性化され，*Hsp70* 遺伝子の転写を活性化する．(B) 冬眠期の中途覚醒時と深冬眠時のシマリスの肝臓核抽出液を用いた HSF1 のウエスタンブロット解析．中途覚醒時で直腸体温 30℃ 以下の個体は深冬眠状態から中途覚醒し始めて 1 時間以内，中途覚醒時で直腸体温 30℃ 以上の個体は中途覚醒し始めてから 2 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．

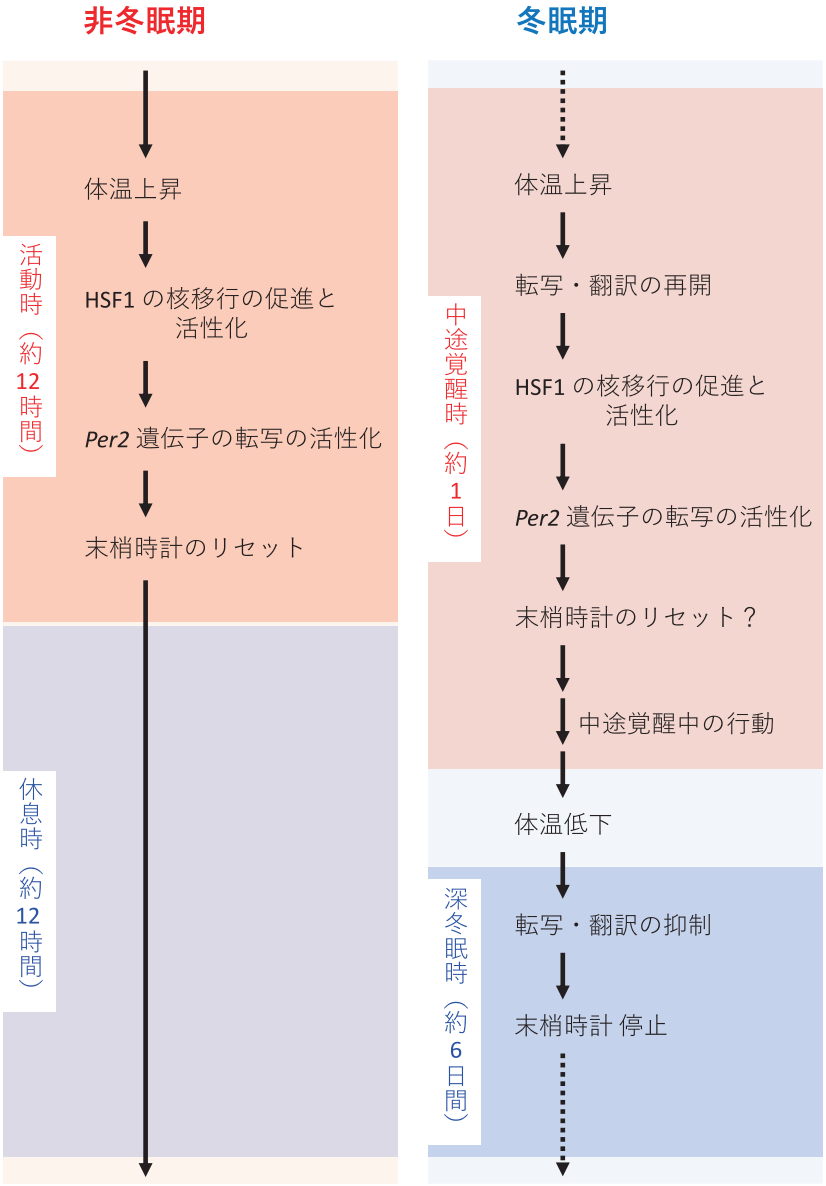


図 5：非冬眠期と冬眠期のシマリスにおける体温変動による HSF1 の活性制御機構を利用した末梢時計のモデル．非冬眠期では，体温の概日リズムによって，活動時に活性化された HSF1 によって *Per2* 遺伝子の転写が活性化され，末梢時計が日々リセットされる．冬眠期では，深冬眠の間は末梢時計は停止しているが，中途覚醒の体温上昇に伴い転写・翻訳が再開し，活性化された HSF1 によって *Per2* 遺伝子の転写が活性化され，増加した Per2 によって一部の遺伝子群の発現が制御される．再び深冬眠にはいるときの体温低下に伴い，転写・翻訳が抑制され，末梢時計は停止する．

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ー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.

低温科学 81 （2023） 131–139
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 131

実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導

堀井　有希[1)]，椎名　貴彦[2)]，志水　泰武[2)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 23 日受理

一部の哺乳動物は，冬季に環境温度付近にまで体温を低下させる冬眠を行う．また，数時間の低体温を呈する日内休眠を行う動物種もある．冬眠や日内休眠のメカニズムを解明する手立てとして，実験室内でそれらを再現することは重要である．シリアンハムスターでは低温で暗期の長い環境において冬眠が誘発され，与える栄養素により冬眠誘発までの期間が変化する．また，マウスでは絶食，スンクスでは寒冷環境が日内休眠を誘発する引き金となる．さらに，冬眠しない哺乳動物であるラットは，薬理学的な方法によって冬眠様の低体温へ誘導することが可能である．本稿では，実験室における哺乳動物の冬眠・休眠の誘導についてまとめ，冬眠研究の展望を論じる．

Induction of hibernation and daily torpor of mammals in the laboratory

Yuuki HORII[1], Takahiko SHIINA[2] and Yasutake SHIMIZU[2]

Some mammals enter hibernation in winter and lower their body temperature to near ambient temperature. Mice and house musk shrews undergo daily torpor, in which they remain hypothermic for several hours. It is important to reproduce hibernation and daily torpor in the laboratory for elucidating their mechanisms. In the Syrian hamster, hibernation is induced under the condition of low ambient temperatures and long dark periods, and the essential time for hibernation induction varies depending on nutrient intake. Fasting and cold environment trigger the induction of daily torpor in mice and in shrews, respectively. Furthermore, rats, which are non-hibernators, can be induced to hibernation-like hypothermia with pharmacological methods. This article summarizes the induction of hibernation and torpor in the laboratory and discusses the prospects for hibernation research.

キーワード：シリアンハムスター，スンクス（*Suncus murinus*），冬眠，日内休眠，人為的冬眠様低体温
Syrian hamster, house musk shrew (*Suncus murinus*), hibernation, daily torpor, artificial hibernation-like hypothermia

1．はじめに

ほとんどの哺乳動物は，恒温動物と呼ぶにふさわしく，外気温がどのように変化しようとも 37℃ 程度の体温を維持している．しかし，リスやハムスターなど一部の小型齧歯類をはじめ哺乳動物の一部は，気温低下や食糧不足など冬季の厳しい環境を耐えるために，体温を大幅に下げ冬眠する．マウスなどは，特定の条件下で数時間の単位で体温を低下させる日内休眠を行うが，哺乳動物の日内休眠は多くの点で冬眠と類似性の高い行動である．

連絡先
志水　泰武
岐阜大学　応用生物科学部　獣医生理学研究室
〒501–1193　岐阜県岐阜市柳戸 1–1
Tel. 058–293–2940
e-mail：shimizu.yasutake.b5@f.gifu-u.ac.jp
1）岐阜大学　糖鎖生命コア研究所　糖鎖分子科学研究センター　研究基盤部門
岐阜県岐阜市柳戸 1–1
Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Gifu University, 1–1 Yanagido, Gifu 501–1193, Japan
2）岐阜大学　応用生物科学部　獣医生理学研究室
岐阜県岐阜市柳戸 1–1
Laboratory of Veterinary Physiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1–1 Yanagido, Gifu 501–1193, Japan

変温動物の両生類や爬虫類が外気温の低下に伴い低体温となることとは対照的に，哺乳動物の行う冬眠や休眠は制御された低体温である．例えば，冬眠中のハムスターは，環境温度が上昇せずとも一定期間の低体温から中途覚醒し摂食や飲水，排便や排尿を行う．このことからも，哺乳動物の冬眠が受動的な低体温でないことがわかる．

冬眠中の動物は，放射線照射や感染症に耐性があると言われている（Musacchia and Barr, 1968; Ghosh et al., 2017; Sharapov, 1984）．また，有害化学物質を投与しても組織傷害が起こらないこと，虚血再環流傷害が起こらないこと，さらには寿命が延長することや廃用性筋萎縮が起こらないこと（宮崎の稿参照），等々，医学領域で活用可能な多くの特徴が認められる（Kemper and Ruben, 1982; Kondo et al, 2006；川道ほか，2000）．このようなメリットをヒトや伴侶動物で再現できれば，さまざまな疾病に対して新しい視点の治療法を提供できる可能性がある．それゆえに，冬眠の機序を解明し，冬眠しない動物に人工冬眠を誘導するための研究は重要である（小野の稿参照）．このような研究を推進するためには，実験室内で冬眠や休眠を誘発する必要がある．

2．冬眠と休眠

2.1　自然界における冬眠と休眠の特徴

哺乳動物は，代謝を調節することで，環境温度が上がろうが下がろうが，深部体温をある一定の範囲内に収めるように制御している．恒温動物と呼ばれる所以である．ところが，哺乳動物の中には，代謝を低下させて体温を著しく低下させる動物種が存在する．このような低代謝，低体温に陥る現象を哺乳動物における「休眠（Torpor）」という．その中で，日周変動の一部として低体温となる現象を「日内休眠（Daily torpor）」と呼び，比較的長期間に渡って休眠状態を維持する現象を「冬眠（Hibernation）」と呼ぶ（Ruf and Geiser, 2015）．

「冬眠」は，冬季の厳しい生育環境を乗り切るための適応といえる．冬眠する哺乳動物は，リス，ヤマネ，ハムスター，クマ，コウモリ，キツネザルなど多岐にわたる（川道ほか, 2000）．有名なのは，リスやハムスターといった小型齧歯類とクマである．どちらの動物も冬眠する哺乳動物として一般的に理解されているが，その冬眠様式には異なる点がある．リスやハムスターといった小型齧歯類の冬眠は，冬眠期間中ずっと低体温状態にあるわけではない．数日間の低体温の状態（深冬眠，持続的冬眠，休眠バウトとも呼ぶ）と半日～1 日程度の平常体温の状態（中途覚醒）を交互に繰り返す．深冬眠の際の体温は10℃以下となり，環境温度によっては 0℃付近に達することがある（川道ほか，2000）．種によっては中途覚醒時に排泄や摂食を行う（Sonoyama et al., 2009）．

一方，クマ類の冬眠は小型齧歯類のものとは少し異なった様式を取る．クマ類の冬眠時の体温は 30℃以上であり，小型齧歯類の冬眠時と比較し，体温低下はわずかである．中途覚醒は行わず，冬眠期間中は低体温状態が数ヶ月間に渡って維持される．また，冬眠期間中，飲まず食わずで過ごすことも特徴である（川道ほか, 2000）．

「日内休眠」は，アカネズミやハツカネズミ（マウス）など特定の哺乳動物が，体温や代謝活動を低下させる現象である．休眠期間が 1 日のうち数時間であり，体温の低下も冬眠ほど顕著ではない．冬眠と同様に，低温環境や日照時間の短縮，食餌制限が日内休眠の引き金となる（川道ほか，2000）．

2.2　冬眠，睡眠，麻酔で共通する意識消失

休眠を含めた冬眠状態は，睡眠や麻酔と比較されることが多い．共通項は「意識の消失」である．意識というのは定義の難しい言葉であるが，“覚醒していて外界の情報が認知できる状態”と考えてみる．認知とは，外界の情報を受容し意味のあるものとして理解する過程で最も高度な営みであり，その前段階に感覚，知覚がある．ここで，冬眠と睡眠，麻酔の異同を論議する上で重要な，感覚，知覚，認知という言葉について整理しておく．私たちは通常の生活の中で，目から入った情報を画像として「見る」こと，耳から入った情報を音として「聞く」ことに違和感を感じることはないが，外界から与えられる刺激は光であれ音であれ，全て感覚神経のインパルスに変換されている．モールス信号のような入力であるにも関わらず，目から入った情報が画像として認識されるのは，目で光の情報をインパルスに変換し，その情報が視覚を処理する領域に送られ，画像として認識されているからである．このように外界の情報が受容され脳に送られることを「感覚」という．この感覚情報から，入力情報が何であるか認識することを「知覚」という．外界にある対象を知覚した後に，経験や知識，記憶などに基づいた思考，考察，推理によって，解釈する，知る，理解するにまで至ったことを「認知」と呼んでいる．例えば，食べ物を紹介するテレビを見ているとき，目から入った情報が画像になるのが「感覚」，その画像が食べ物とわかることが「知覚」，美味しそうだ，自分も食べたいと感じることが「認知」である．

冬眠，睡眠，麻酔は，意識の消失，つまり覚醒を保てない，認知ができないという点では同じであるが，感覚，

知覚の有無において明確な違いがある．麻酔は，外科手術ができるように無痛状態を確保しなければならないので，感覚や知覚が成立しないようにしておく必要がある．一方，睡眠時には少なくとも感覚は機能している．覚醒時よりも感度が低くなっているものの，ほとんどの感覚器から外界の情報が脳に入力され，それに基づく反応が起こっている．目覚まし時計の音，カーテンを開けられたときの光，皮膚の痒みや痛み，嫌なニオイ，等々，五感のどこからでも睡眠を中断させる刺激を入れることができる．麻酔による意識消失と睡眠時の意識消失の違いを端的にまとめるなら，感覚が成立するかしないかということになる．冬眠中の動物は，体を触ったり，外気温を上げたりすれば，たちまち体温を上昇させて覚醒してくる．そっと持ち上げる程度の刺激では覚醒することはないので，睡眠よりも感度は下がっていると思われるが，明らかに感覚は機能している．したがって，意識は消失しているが感覚は機能しているという点からは，冬眠は睡眠に近い状況にあると言える．冬眠中の動物は，触れても体温を感じることができず，呼吸を目視で確認することも困難であるため，感覚を成立させる程度に脳が活動しているとは思えない状態であるが，間違いなく機能している．

冬眠と睡眠には類似性は見出されるものの，睡眠の延長線上に冬眠があるか否かは不明である．冬眠中の動物から脳波を記録することができないために，比較検討することが困難であった．このことと関連して，興味深い論文が発表されている．ジリスは冬眠期間を通して低体温状態で過ごすのではなく，一定期間過ぎると中途覚醒を示す．この中途覚醒中には，徐波睡眠と同じような脳波像を示すという（Daan et al., 1991; Trachsel et al., 1991）．このことは，冬眠中は断眠状態にあり，体温を復帰させるという多大なコストをかけて中途覚醒するのは眠るためであるという解釈につながる．この解釈に従えば，冬眠と睡眠は全く異なる事象であるということになる．その後の検討で，中途覚醒中に発生する脳波像は，正常な睡眠とは異なるメカニズムであることも示唆されており（Larkin and Heller, 1999），結論を出すまでに更なる検討が必要であろう．

2.3 哺乳動物の冬眠と休眠のモデル動物

冬眠する哺乳動物として認知度が高いクマでは，冬眠中の体温低下はそれほど顕著ではなく，せいぜい30℃付近までの低下にとどまる．特徴的なのは，冬眠期間中にいっさい摂食や飲水をしないし，排便や排尿もしないということである．しかも雌のクマは冬眠中に出産し，子熊に授乳するという（川道ほか，2000；Shimozuru et al., 2013）．冬眠前に充分に脂肪を蓄えるので，これが冬眠中のエネルギー源になることは間違いないであろう．しかしながら，哺乳動物には脂肪酸をグルコースに変換する代謝経路が備わっていないことを考えると，子熊に与える糖質をどのように確保するのか等々，単純には説明できないことが多い．一般的な哺乳動物では，飢餓時の糖新生の基質は，骨格筋のアミノ酸が主体となるが，冬眠中にこの反応を多用すればアンモニアの処理が不可欠であり，排尿しないことと矛盾する．また，骨格筋をすり減らすことは，春先になって冬眠からさめた後には大きな支障を来すと予想される．実際に冬眠中のクマの血漿グルコースレベルは低下しておらず（Græsli et al., 2015），クマの冬眠時の筋肉のタンパク質減少量はわずかである（Lohuis et al., 2007; Tinker et al., 1998）．エネルギー維持のためにケトン体を活用することも予想できるが，呼吸数が激減している冬眠中にはケトン体によって酸性に傾いた血液に対して呼吸により補償をかけることが困難であり，酸塩基平衡の問題を抱えるであろう．また，一般的な哺乳動物におけるケトン体の最大消費器官である脳は活性が落ちている状態では，ケトン体の生成に大きな意義を求めるのが困難である．このように，クマは，エネルギーバランスの維持の仕組みや有害老廃物の生成と除去の仕組みを考えると非常に興味深い動物であるが，実験室レベルで扱える動物ではない．

それに対して，ハムスターなど小型齧歯類は，入手が容易で，ラットやマウス等と同じ実験室内での飼育が可能であるため，多くの研究室で使われている．リスは，冬眠に関する多くの重要な発見を導いてきた動物種であるが，入手，飼育の面で難のある動物である．日内休眠のモデルとしてはマウスがよく活用されている．最近，私たちは食虫目のスンクスが日内休眠を示す有用なモデル動物であることを見出し，注目している．

3．実験室内における冬眠・休眠誘導

3.1 ハムスターの冬眠

シリアンハムスター（ゴールデンハムスター）は，夏季でも環境を制御することにより実験室内で冬眠を誘発できることから，冬眠研究に使いやすい動物である．図1に，冬眠中のシリアンハムスターを示した．Curly shapeと呼ばれる丸まった姿勢をとるのが特徴である．冬眠中のハムスターに触れたときには，体温を感じることができず死亡個体と区別できないことがしばしばあるが，足蹠部の皮膚にチアノーゼ様の色変がないことが生

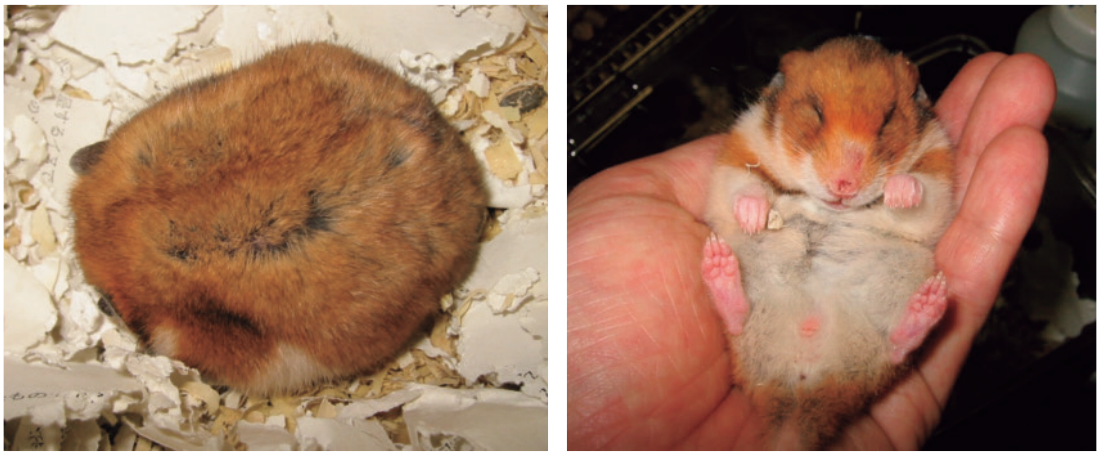


図 1：冬眠中に Curly shape を呈するシリアンハムスター

存していることの指標となる．

覚醒時のハムスターでは，心拍数が 350 回/分以上，呼吸数が 90 回/分程度であるのに対して，冬眠中には心拍数が 15 回/分，呼吸数が 2 回/分にまで低下する．このような極端な心拍数や呼吸数の低下は，低体温に起因する受動的な低下であるとともに，自律神経を介する調節性の低下という要素も含まれると考えられる．いずれにせよ，心臓循環器系と呼吸器系は，低体温下での組織の酸素要求を満たすべく確実に機能している．また，脳も機能しており，積極的に代謝活性や体温を調節していると考えられる．冬眠中のハムスターの体温は，外気温より数度高いレベルに維持されている．5℃の環境温度に設定し，実験室内で冬眠を誘発した場合，平均体温が 6℃程度となる．一般的に，哺乳動物は 20℃以下に体温が低下すると，心臓や神経系が機能しなくなり凍死する（Ivanov, 2000; Johansson et al., 1996）ことから，冬眠中のハムスターには極度の低体温下でも生存を可能にする仕組みがあると言える．私たちは，この低温耐性機構に寄与する可能性のある低温ショックタンパク質において，冬眠時に特徴的な選択的スプライシングの変化が起こることを明らかにした（Horii et al., 2019; Sano et al., 2015）．低温ショックタンパク質は心臓，脳，肝臓，腎臓という多くの臓器に発現しており，RNA 結合タンパク質として多くのタンパク質の転写後調節に関与している．冬眠時の特殊な制御機構によって，低温ショックタンパク質が全身の細胞内で発現を効率化し，細胞機能を調節することで冬眠する哺乳動物を生存へ導く可能性がある．

さて，当然のことながら，低体温に陥るということは同時に平常体温へと回復するフェーズが存在するということである．前述のように，ハムスターの冬眠というのは全期間を眠り続けるのではなく，持続的冬眠期（深冬眠）と中途覚醒期を冬眠期間中に何度も繰り返すことを特徴としている．深冬眠からの覚醒時の体温は，低下した状態から正常体温付近まで，30℃もの顕著な変化を起こす．また，心拍の回復にともない，全身の血流も著しく変化する．つまり，ハムスター等の冬眠の興味深い仕組みを整理すると，①代謝を著しく低下させて低体温のまま長期間にわたり生命を維持する仕組みに加えて，②低体温の急激な回復に耐えうる生命維持の仕組みがあると考えられる．このような冬眠時の低体温からの覚醒にともなう仕組みの解明は，虚血性疾患の再潅流障害などにアプローチするための重要な手掛かりになると考えられている．

シリアンハムスターの冬眠を実験室内で誘発するためには，秋から冬へ移行する時期の気温や日照時間を再現するように環境を制御する必要がある．通常，冬眠を誘発するまでに 2〜3ヶ月の期間を要することになるが，これは冬眠研究を遂行する上でひとつの障壁となっている．私たちは，冬眠誘発に対する気温や日照時間の影響に加えて，摂取する栄養素の重要性を考えて条件を検討した．ハムスターには，野生齧歯目が摂食すると考えられる「木の実」を模倣して，ヒマワリの種子を与えた．また，冬季の食物不足の状況を模して給餌の制限も行った．ヒマワリの種子を充分に与えたのち給餌を制限した個体は，自由に摂食をさせた場合と比較して短期間で冬眠状態に入った（椎名ほか，2007）．しかし，市販のハムスター用ペレットを与えたコントロール個体は，給餌を制限しても短期間では冬眠状態に入ることができなかった．また，ヒマワリの種子を給餌したハムスターでは，ペレットの場合より有意に高体重であった．これらの結果は，低温および短日環境に加えて，食物の量と組成，

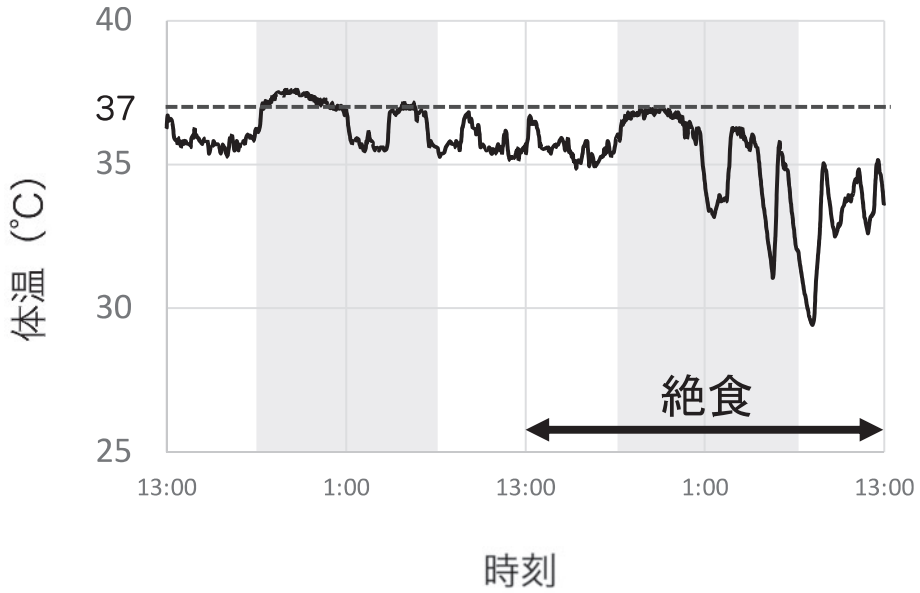


図 2：マウスにおける絶食誘導性日内休眠時の体温変化
マウスの皮下温度を経時的に測定した．グレーの背景は暗期，白の背景は明期を表す．

そして体重の増加が冬環境における冬眠行動の誘発に深く関連することを示唆するものである．ヒマワリの種子の重要性は，飼料にヒマワリ油を添加するとシマリスの深冬眠の持続時間が長くなったという報告からも支持される（Dark, 2005）．過去の報告で多価不飽和脂肪酸が豊富な食物油が哺乳動物の冬眠の持続時間と深さを増強するというものがある（Harlow and Frank, 2001）．また，冬眠する哺乳動物の肝臓では，ビタミン E のアナログである α-トコフェロールが保持されており，寒冷による細胞死を防いでいると報告されている（Anegawa et al., 2021）（曽根の稿参照）．このことも，トコフェロールを含有するひまわり種子が冬眠の誘発に重要な要素である可能性を支持している．

シリアンハムスターを用いた冬眠の誘発は，段階的な気温低下や日照時間の短縮を行うための特殊な飼育室を必要としない上に，比較的短期間で冬眠中の哺乳動物を得られるため，実験を遂行する上で有用であると考えられる．

3.2　マウスの休眠

マウスは実験動物として最も広く使用されている哺乳動物である．一般的な実験室の条件である 22±2℃，自由摂食の条件下では，哺乳動物の特徴である恒温性を保つ．また，寒冷環境下で飼育しても，30℃を下回るような体温低下はない．一方で，マウスを絶食させると，一時的に体温が 30℃を下回る日内休眠が誘発される（Webb et al., 1982）．図 2 に示すように，室温が 22℃の環境下であっても，体温が波打って低下する日内休眠を再現することができる．

また，絶食以外にも，恐怖に関連する 2-methyl-2-thiazoline（2MT）の香りによってマウスが低代謝を引き起こし，10℃以上の体温低下を引き起こすことが報告されている（Matsuo et al., 2021）．さらに，2MT の刺激による低体温状態は，冬眠する哺乳動物動物のように，低酸素や虚血再灌流障害からの保護作用を示した．これらの報告のように，一般的な哺乳動物として実験に使用されているマウスにおいても，絶食や恐怖の刺激によって日内休眠様の低体温を誘発できることが明らかとなり，様々な研究展開が考えられる．

日内休眠中のマウスは，冬眠する哺乳動物と類似し，休眠中には明らかに活動性が低下する．また，冬眠と同様，接触刺激等で容易に活動量を増加させ，体温を回復させる．日内休眠時の最低体温は冬眠時よりも高く，低体温の維持時間も冬眠と異なり数時間であることから，冬眠する哺乳動物とは異なるメカニズムの存在を考慮する必要がある一方で，マウスは比較的容易に遺伝子改変を行うことができ，詳細な解析が可能である優れた実験動物である．マウスの日内休眠を利用し，休眠のメカニズムのさらなる解明が行われることが期待される．

3.3　スンクスの休眠

スンクス（*Suncus murinus*）は，成熟体重が約 30〜70 g の小型の実験動物で真無盲腸目（しんむもうちょうもく）トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属する，東南アジアを原産

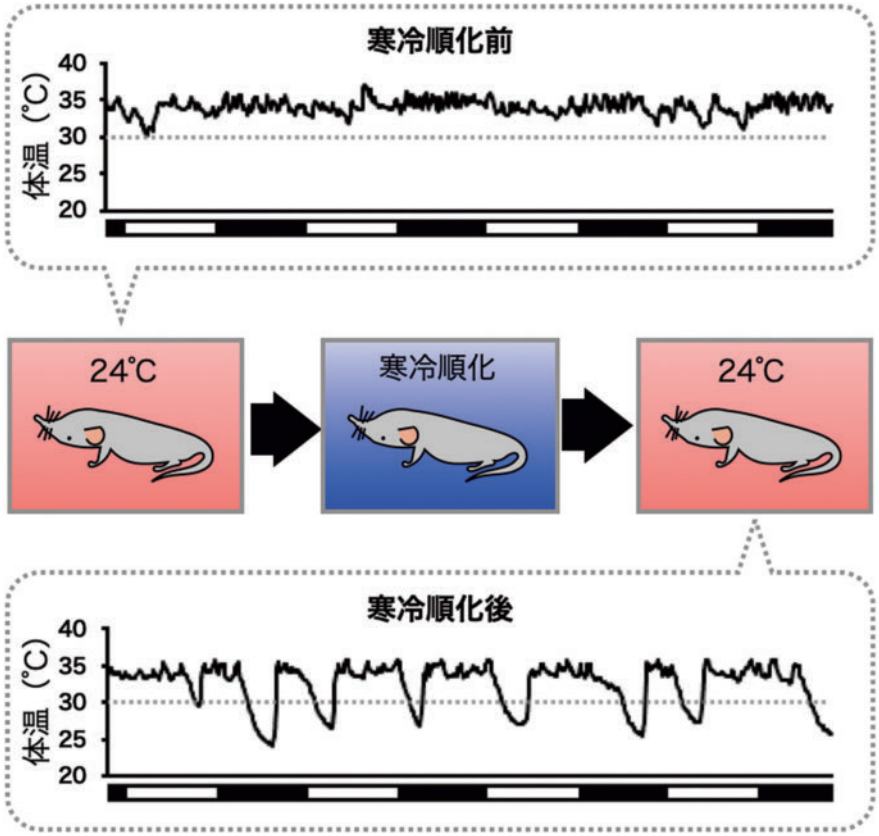


図 3：スンクス（*Suncus murinus*）における寒冷順化による日内休眠パターンの変化
スンクスの皮下温度を経時的に測定した．上段には寒冷順化前の体温，下段には寒冷順化後の体温を示した．横軸は時間を表しており，白抜きが明期，黒が暗期を示している．（Horii et al. (2022). Suncus murinus as a novel model animal that is suitable for elucidating the mechanism of daily torpor. *Biomed Res (Tokyo)*, **43**(2), 53–57.より改変）

とした夜行性の哺乳動物である（Kurachi et al., 2007）（大舘の稿参照）．スンクスは齧歯目であるマウスやラットが行わない，嘔吐をするなどの特徴から，消化管の研究等にも有用な動物である．スンクスは暖かい地方に生息し，低温環境下では不動化することから，低温に不耐性な動物であるとされてきた（織田ほか，2011）．一方で，前述のように，スンクスも休眠を行う動物である（Ishii et al., 2002）．我々の研究では，スンクスが環境温度によって日内休眠を調節する動物であることを見出してきた．24℃の部屋で飼育すると，わずかな日内変動はあるものの体温は著しく低下することはない．一方，室温を20℃に設定すると，スンクスの体温は平均約 3 回/4 日という頻度で 30℃以下の低体温を呈する．さらに室温を16℃，12℃，8℃と低下させると，室温の低下にともない，体温が 30℃以下の低体温の時間は延長し，スンクスは平均約 5 回/4 日という高頻度で日内休眠をおこなうようになる．このことから，スンクスは寒冷の環境刺激によって日内休眠を誘発することのできる実験動物であるといえる（Horii et al., 2022）．さらに，非常に興味深いことに，このように寒冷を経験したスンクスを，本来日内休眠をほとんど行わない 24℃の室温におくと，寒冷経験前と比較し頻繁に日内休眠を行うようになる（図 3）．このことは寒冷環境で休眠のためのプライミングが行われ，その後の 24℃環境においても日内休眠を引き起こしやすいような変化が誘導されることを示唆する．寒冷順化がスンクスにもたらす変化の実態等，今後解明すべき課題が多く残されている．

さて，スンクスにおける日内休眠は，制限給餌を行なわずに寒冷刺激により誘発することができるが，マウスは制限給餌なしでは寒冷による日内休眠は行わない．シベリアンハムスターを用いた研究では，絶食誘導性の日内休眠と寒冷に誘導される日内休眠は様相が異なることが報告されている（Diedrich et al., 2015）．マウスにおける絶食誘導性の日内休眠の研究に加え，スンクスの寒冷誘導性の日内休眠の研究という異なる手法の休眠誘導によって，哺乳動物の普遍的な休眠メカニズムの解明に寄与できると期待している．スンクスは遺伝子組換え等の技術が発展しておらずマウスと比較し未開拓な点の多い実験動物ではあるが，冬眠・休眠の機序を解明するためのモデルとして，興味深い実験動物であると言える．

4．冬眠しない哺乳動物における人為的冬眠様低体温誘導

冬眠する哺乳動物の特殊な性質を医療に活かす試みとして，これまで冬眠する哺乳動物を用いた研究を紹介してきた．ただその一方で，体温の低下は冬眠しない哺乳動物にとって一般に有害な事象である．例えば，ヒトでは体温が 20℃ 以下になると心室細動などの致死的な不整脈が生じるため（Ivanov, 2000; Johansson et al., 1996），極度の低体温状態に誘導することは容易ではない．冬眠の特質を医療に応用するためには，冬眠しない動物を障害なく低体温状態に誘導するとともに正常体温に復帰させる方法の確立が必須である．そこで，冬眠しない哺乳動物を冬眠様の極度の低体温状態に安全に誘導する方法の確立についての研究を紹介したい．

4.1　アデノシン A1 受容体シグナルを用いた低体温誘導

ハムスターにおいては，中枢のアデノシン A1 受容体を阻害することにより，冬眠導入期の体温低下がキャンセルされることが報告されている（Tamura et al., 2005）（渡邊の稿参照）．また，アデノシン A1 受容体アゴニストである N6-cyclohexyladenosine（CHA）をハムスターの側脳室内へ投与して低温環境に置くと，冬眠と同じような低体温に誘導することが可能である（Miyazawa et al., 2008）．これらの事実は，冬眠時の体温低下に中枢のアデノシン A1 受容体の活性化が重要であることを示すものである．興味深いことに，CHA の脳室内投与によって誘発される低体温は，冬眠しないラットにおいても再現できた（Shimaoka et al., 2018）．さらに，通常は致死的な 20℃ 以下の体温であっても本方法で低体温へ誘導したラットでは洞調律（心臓の規則正しいリズム）は維持されること，体温を回復させた後に臓器傷害を示す所見が認められないことも確認できた．これらの成果は，冬眠する哺乳動物が自発的に低体温となる仕組み，および低温による悪影響を回避する仕組みが，冬眠に固有の機序に依存するものではないことを示唆する点で極めて重要である．多くの哺乳動物に普遍的に備わっている仕組みを上手く使うことによって，特定の種の動物が冬眠を成立させているのであれば，人為的にその仕組みを活性化させれば人工冬眠を誘発できることになる．完全に冬眠と一致する低体温でなくとも，冬眠中の動物が示すメリットを引き出すための安全な低体温をヒトや伴侶動物で誘導できると期待される．

4.2　麻酔薬を用いた低体温誘導

低体温の医療応用を前提とした場合，脳室内投与は必ずしも適切な方法とは言い難い．このような課題に対応するために，私たちは麻酔により体温が低下すること（Shimizu and Saito, 1991）に着目して，安全な低体温誘導法の確立に着手した．ラットに麻酔を施し冷却すると，体温は顕著に低下するものの，25℃ を下回ると正常な心拍動が維持されず，最終的には心停止してしまう（Shimaoka et al., 2021）．一方，冬眠する哺乳動物であるハムスターでは，麻酔下で強制的に 25℃ 以下の低体温へ誘導しても心停止に至ることはない（Miyazawa et al., 2008）．このような事実を素直に受け入れれば，生得的な低温耐性能があるから冬眠する哺乳動物は低体温下で生存できる，それゆえに低温耐性能のない動物に冬眠様の低体温を誘導することは不可能である，という結論に至るのが妥当であり，ラットを低体温に誘導するトライアルをこれ以上継続する理由は見あたらない．しかし，CHA の脳室内投与実験から，冬眠しない動物でも 20℃ 以下の低体温で臓器傷害を起こすことなく維持し，問題なく平常体温に復帰させられることが示されたので，条件検討を粘り強く繰り返すことができた．試行錯誤の結果，吸入麻酔薬を用いて，体温低下に伴い麻酔濃度を調節する方法を確立するに至った（Shimaoka et al., 2021）．体温がある時点に達した段階で麻酔量を徐々に落としていくと，最終的に 15℃ の状態で 6 時間は生存できる．さらにここから体温の回復も可能である．また，AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ），ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ），LDH（乳酸脱水素酵素），BUN（尿素窒素）といった主要臓器の障害の指標となる血液生化学値の測定結果から，この方法で低体温状態をある程度の時間持続しても臓器機能に大きな影響を与えないと考えられた．現在，この方法で誘導した低体温に，冬眠する哺乳動物が示す医療応用可能な特性が発現しているかを検証しているところである．将来的には，極度の低体温域を活用した低体温療法，さらには夢の「人工冬眠」に応用できる可能性があると期待している．

麻酔による低体温は，麻酔薬が体温調節中枢を抑制することで誘導されるものと考えられる．実際，ラットの体温が 27.5℃ で麻酔吸入を停止した場合には，体温調節中枢の機能が回復するためか，震えが誘発され体温が上昇する．興味深いことに，22.5℃ の時点で麻酔を停止した場合は，吸入を停止したにも関わらず震えを起こすことなく体温は低下し続け，15℃ の体温で少なくとも 6 時間の維持が可能であった（Shimaoka et al., 2021）．この

ことから，体温調節中枢は体温が低くなるにつれて強く活性化されるものの，ある温度を下回ると応答しなくなる性質を持っていると想定できる．熱産生の亢進反応と熱放散の抑制反応を活性化することのできる下限の温度が 27.5℃から 22.5℃の間にあり，それを下回ると冬眠様の低体温へ移行するという考え方である．麻酔による冬眠様低体温誘導では，この下限の温度を下回る体温に誘導するところまで麻酔を存在させることが重要であると予想される．同時に，この下限温度を下回る領域の体温では，麻酔のない状態，すなわち脳の一部は機能する状態であることが，生存に必要であることも特筆すべき点である．つまり，低体温下では，呼吸や心拍等の機能に関しては能動的な生理機能が維持される必要があると考えるのが妥当である．冬眠する動物と冬眠しない動物は，自らの制御でこのレンジに移行できる動物とそうでない動物という区分けが成立するかも知れない．もしこの想定が正しいのならば，体温調節中枢が機能する下限の温度を下回る温度域にまで体温を低下させる手法であれば，麻酔を使用する方法と同様に低体温誘導が可能であると考えられる．例えば，TRPV1 チャネルのアゴニストの全身性の投与は熱放散の促進と震えの抑制により体温を低下させる（Szolcsányi, 2015）ので，このような機序を応用することによっても冬眠様低体温誘導が可能であると期待される．

5．まとめ

哺乳動物の冬眠は，哺乳動物が獲得してきた恒常性を柔軟に変化させ，体内・体外環境の変化に対応するという興味深い生存戦略である．哺乳動物の常識を覆すような冬眠する哺乳動物の生理現象を明らかにし，メカニズムを人工的に再現することは，医療分野，ライフサイエンス研究分野等への多大なる貢献が期待される．

本稿では実験室内における冬眠･休眠の誘導法として，飼育環境等を整え，できる限り生理的な冬眠行動を再現する方法や，麻酔等の非生理的な方法で冬眠時の状態を再現する方法を紹介した．どのような方法を選択し実験を行なっていくかによって，様々なバリエーションの冬眠研究が発展する．国内外のさまざまな冬眠研究が相互作用し，冬眠や休眠に関わる研究成果が実社会へ貢献することを期待している．

参考文献

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 Biology,* **4**(1), 796. doi: 10.1038/s42003-021-02297-6

Daan, S., Barnes, B. M., & Strijkstra, A. M. (1991). Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci Lett,* **128**(2), 265-268. doi: 10.1016/0304-3940(91)90276-y

Dark, J. (2005). Annual lipid cycles in hibernators: Integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr,* **25**(1), 469-497. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092514

Diedrich, V., Kumstel, S., & Steinlechner, S. (2015). Spontaneous daily torpor and fasting-induced torpor in Djungarian hamsters are characterized by distinct patterns of metabolic rate. *J Comp Physiol B,* **185**(3), 355-366. doi: 10.1007/s00360-014-0882-4

Ghosh, S., Indracanti, N., Joshi, J., Ray, J., & Indraganti, P. K. (2017). Pharmacologically induced reversible hypometabolic state mitigates radiation induced lethality in mice. *Sci Rep,* **7**(1), 14900. doi: 10.1038/s41598-017-15002-7

Græsli, A. R., Evans, A. L., Fahlman, Å., Bertelsen, M. F., Blanc, S., & Arnemo, J. M. (2015). Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (Ursus arctos) in Sweden. *BMC Vet Res,* **11**(1), 301. doi: 10.1186/s12917-015-0615-2

Harlow, H. J., & Frank, C. L. (2001). The role of dietary fatty acids in the evolution of spontaneous and facultative hibernation patterns in prairie dogs. *J Comp Physiol B,* **171**(1), 77-84. doi: 10.1007/s003600000148.

Horii, Y., Shimaoka, H., Horii, K., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2019). Mild hypothermia causes a shift in the alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in Syrian hamsters. *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology,* **317**(2), R240-R247. doi: 10.1152/ajpregu.00012.2019

Horii, Y., Okadera, K., Miyawaki, S., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2022). Suncus murinus as a novel model animal that is suitable for elucidating the mechanism of daily torpor. *Biomed Res (Tokyo),* **43**(2), 53-57. doi: 10.2220/biomedres.43.53

Ishii, K., Uchino, M., Kuwahara, M., Tsubone, H., & Ebukuro, S. (2002). Diurnal fluctuations of heart rate, body temperature and locomotor activity in the house musk shrew (*suncus murinus*). *Exp Anim,* **51**(1), 57-62. doi: 10.1538/expanim.51.57

Ivanov, K. P. (2000). Physiological blocking of the mechanisms of cold death: theoretical and experimental considerations. *J Therm Biol,* **25**(6), 467-479. doi: 10.1016/s0306-4565(00)00012-7

Johansson, B. W. (1996). The hibernator heart--nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res,* **31**

(5), 826–832. doi: 10.1016/0008-6363(95)00192-1

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

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**(1), 161–172. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.017

Kemper, G. B., & Ruben, R. L. (1982). Effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene on the integument of the hibernating and nonhibernating 13-lined ground squirrel. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol*, **73**(2), 445–450. doi: 10.1016/0306-4492(82)90151-4

Kurachi, M., Chau, B. L., Dang, V. B., Dorji, T., Yamamoto, Y., Nyunt, M. M., Maeda, Y., Chhum-Phith, L., Namikawa, T., & Yamagata, T. (2007). Population structure of wild musk shrews (*Suncus murinus*) in Asia based on mitochondrial DNA variation, with research in Cambodia and Bhutan. *Biochem Genet*, **45**(3–4), 165–183. doi: 10.1007/s10528-006-9051-0

Larkin, J. E., & Heller, H. C. (1999). Sleep after arousal from hibernation is not homeostatically regulated. *Am J Physiology*, **276**(2), R522-R529. doi: 10.1152/ajpregu.1999.276.2.r522

Lohuis, T. D., Harlow, H. J., & Beck, T. D. I. (2007). Hibernating black bears (Ursus americanus) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **147**(1), 20–28. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.12.020

Matsuo, T., Isosaka, T., Tang, L., Soga, T., Kobayakawa, R., & Kobayakawa, K. (2021). Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors. *Commun Biology*, **4**(1), 101. doi: 10.1038/s42003-020-01629-2

Miyazawa, S., Shimizu, Y., Shiina, T., Hirayama, H., Morita, H., & Takewaki, T. (2008). Central A1-receptor activation associated with onset of torpor protects the heart against low temperature in the Syrian hamster. *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology*, **295**(3), R991-R996. doi: 10.1152/ajpregu.00142.2008

Musacchia, X. J., & Barr, R. E. (1968). Survival of whole-body-irradiated hibernating and active ground squirrels; Citellus tridecemlineatus. *Radiat Res*, **33**(2), 348. doi: 10.2307/3572485

織田銑一.，東家一雄.，宮木孝昌.（2011）．スンクスの生物学（磯村源藏 監修）．学会出版センター，東京．

Ruf, T., & Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev*, **90**(3), 891–926. doi: 10.1111/brv.12137

Sano, Y., Shiina, T., Naitou, K., Nakamori, H., & Shimizu, Y. (2015). Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem Biophys Res Commun*, **462**(4), 322–325. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.135

Sharapov, V. M. (1984). Influence of animal hibernation on the development of mycoses. *Mycopathologia*, **84**(2–3), 77–80. doi: 10.1007/bf00436516

関島恒夫.（2002）．冬眠できない動物の体温低下現象．遺伝，**56**(1)，61–67.

椎名貴彦.，Marwan Draid.，志水泰武.，武脇　義.（2007）．哺乳動物の冬眠行動に影響する環境条件．日本野生動物医学会誌，**12**，35–39.

Shimaoka, H., Kawaguchi, T., Morikawa, K., Sano, Y., Naitou, K., Nakamori, H., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2018). Induction of hibernation-like hypothermia by central activation of the A1 adenosine receptor in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci*, **68**(4), 425–430. doi: 10.1007/s12576-017-0543-y

Shimaoka, H., Shiina, T., Suzuki, H., Horii, Y., Horii, K., & Shimizu, Y. (2021). Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci*, **71**(1), 10. doi: 10.1186/s12576-021-00794-1

Shimizu, Y., & Saito, M. (1991) Activation of brown adipose tissue thermogenesis in recovery from anesthetic hypothermia in rats. *Am J Physiol*, **261**, R301-R304. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261. 2.R301.

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., & Tsubota, T. (2013). Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. *J Mammal*, **94**(3), 618–627. doi: 10.1644/12-mamm-a-246.1

Sonoyama, K., Fujiwara, R., Takemura, N., Ogasawara, T., Watanabe, J., Ito, H., & Morita, T. (2009). Response of Gut Microbiota to Fasting and Hibernation in Syrian Hamsters. *Appl Environ Microbiol*, **75**(20), 6451–6456. doi: 10.1128/aem.00692-09

Szolcsányi, J. (2015). Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature*, **2**(2), 277–296. doi: 10.1080/23328940.2015.1048928

Tamura, Y., Shintani, M., Nakamura, A., Monden, M., & Shiomi, H. (2005). Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res*, **1045**(1–2), 88–96. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.029

Tinker, D. B., Harlow, H. J., & Beck, T. D. (1998). Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol Zool*, **71**(4), 414–424. doi: 10.1086/5154

Trachsel, L., Edgar, D. M., & Heller, H. C. (1991). Are ground squirrels sleep deprived during hibernation? *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology*, **260** (6), R1123-R1129. doi: 10.1152/ajpregu.1991.260.6.r1123

Webb, G. P., Jagot, S. A., & Jakobson, M. E. (1982). Fasting-induced torpor in Mus musculus and its implications in the use of murine models for human obesity studies. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, **72**(1), 211–219. doi: 10.1016/0300-9629(82)90035-4

低温科学 81 （2023） 141–147
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 141

人工冬眠の実現にむけた休眠研究の取り組み

小野　宏晃[1)]，砂川　玄志郎[1)]

2022 年 12 月 20 日受付，2023 年 1 月 20 日受理

動物は冬季や食料不足に直面すると，生命機能を必要最小限に絞り込むことで，能動的にエネルギー必要量を減らす戦略をとることがある．これを「休眠（torpor）」と呼び，休眠する期間によって数ヶ月にわたる季節性の冬眠（hibernation）と，数時間程度の日内休眠（daily torpor）の 2 つに大別される．休眠の驚くべき特徴は，代謝と体温が低下するだけではなく，休眠から醒めた後に生体がなんら障害を受けずに正常に機能することにある．もし低代謝耐性と低体温耐性を人間に実装すること（人工冬眠）ができれば，呼吸・循環不全に代表されるようなエネルギー供給不足が問題となる疾患への新しい治療法になることが期待される．

Torpor research toward the synthetic hibernation

Hiroaki Ono[1] and Genshiro A. Sunagawa[2]

Some mammals actively reduce energy demand by minimalizing their vital biological functions when facing winter or starvation. This is called torpor, divided into either daily torpor (minutes to hours in length) or hibernation (days to weeks). The surprising features of hibernation are not only hypometabolism and low body temperature but their biological function remaining intact after recovering from torpor. Implementing such hypometabolic and low body temperature resistance in humans as synthetic hibernation is expected to become a new treatment for diseases with insufficient energy supply, such as respiratory and circulatory failure.

キーワード：冬眠，日内休眠，能動的低代謝，人工冬眠
hibernation, daily torpor, active hypometabolism, synthetic hibernation

1．はじめに

ヒトを含む多くの哺乳類では，高度に発達した脳神経系により体温と代謝が調節されており，外的・内的環境の変化に対する恒常性を獲得している．地球上の大多数を占める変温性の生物と比べて，恒常的な体温・代謝調節能を有する生物は，行動や繁殖における自由度が著しく大きいという理由から，生存のための多くの利点を享受してきた．しかし，このような恒常性の獲得には，内的・外的環境の変化を検知して，それに応じたフィードバック制御を常に行う必要があるため，エネルギーの必要量が増大した．ところが自然界では，季節や環境の変動によって栄養源の入手が困難になるため，エネルギーの供給量が必要量を下回ってしまう状況がある．この状

連絡先
砂川　玄志郎
国立研究開発法人理化学研究所　生命機能科学研究センター（BDR）　冬眠生物学研究チーム
〒650-0047　兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3　D 棟 3F 居室　E303（RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR), D-Building/E303, 2-2-3 Minatojima-minami machi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, Japan）
Tel. 078-306-3302
e-mail：genshiro.sunagawa@riken.jp
1）兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3　D 棟 3F 居室 E303
RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR), D-Building/E303, 2-2-3 Minatojima-minami machi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, Japan

況を回避するべく，哺乳類の一部の動物は生命機能を必要最小限に絞り込むことで，能動的にエネルギー必要量を減らす生存戦略を生み出した．これを「休眠（torpor）」と呼び，休眠する期間によって数ヶ月にわたる季節性の休眠状態である冬眠（hibernation）と，数時間程度の日内休眠（daily torpor）の2つに大別される．

冬眠中の哺乳類は，代謝が正常の5%程度までに低下し，体温も4℃前後にまで低下する（Mohr et al., 2020）．実際に，冬眠状態の個体を観察すると，死んでいる状態と区別するのが難しいほどである．冬眠する哺乳類（以降，冬眠動物と記載）は冬季の数ヶ月前から栄養状態や環境を整えることで，冬眠可能な状態にからだを整える必要がある．この意味で，冬眠は計画停電のような休眠状態である．一方，日内休眠は食料不足や日長時間の短縮，低温度によって誘発される休眠状態で，冬眠のように数日にわたって持続することはなく，代謝は正常の30%ほどになり，体温は10℃以下に低下することはまれである（Geiser., 1998）．冬眠と違い事前準備が不要で，その時，環境のエネルギー供給不足に応答できるという点で日頃行う節電のような休眠状態である．

休眠の驚くべき特徴は，代謝と体温が低下するだけではなく，休眠から醒めた後に生体がなんら障害を受けずに正常に機能することにある．例えば，ヒトの体温は通常であれば35℃～37℃の範囲に保たれている．もし，ヒトの体温やエネルギー供給量を休眠時の水準まで抑制してしまうと，重篤な呼吸・循環不全による臓器障害を惹起してしまう．つまり，休眠中の動物では低代謝と低体温に対する耐性を発動していると考えられる．もし低代謝耐性と低体温耐性を人間に実装すること（人工冬眠）ができれば，呼吸・循環不全に代表されるようなエネルギー供給不足が問題となる疾患への新しい治療法になることが期待される．

本稿では，休眠の生理学と休眠の中枢制御基盤に加えて，我々のチームが目指している人工冬眠の実現に向けた最新の取り組みを紹介する．また，最後に休眠研究の課題を議論して，休眠研究の方向性を提示したい．

2．休眠の生理学

休眠の生理学を理解するために，まずは“代謝”の実体について具体的なイメージをもち，どのように測定されるのかを理解するところからはじめる．一言でいうと，代謝とは「生物が外界から取り入れた有機物を，酸素を使って燃焼し，熱エネルギーや化学エネルギーを生み出すプロセス」である．従って，代謝を測定するためには，「酸素をいくら使ったか（＝酸素消費量）」を測定すればよい．また代謝のうち，生命の維持に最低限のエネルギー必要量を基礎代謝と呼ぶ．休眠の本質は，基礎代謝を自ら低下させること，すなわち「能動的低代謝（active hypometabolism）」にある．

能動的低代謝についての理解を深めるために，低代謝と低体温の因果性について考察してみる．まずダイナミクスの視点として，休眠に入るときの酸素消費量と体温を経時的に観察すると，代謝が体温よりも先に低下することが知られている（Heldmaier et al., 2004）．これは，全身麻酔による強制的な低体温や，循環不全や脳卒中で観察される病的な低体温症では，代謝と体温がほぼ同時に低下することと対照的である．つぎに，物理化学的な視点として，代謝も生化学反応であるから，その反応速度は温度に影響される．ここで，温度が10℃上昇すると，化学反応の速度が何倍になるかを指数化したものが温度係数（Q10）である（Glasstone., 1969）．通常，この数値は2～3の値をとる．すなわち，10℃あがるごとに，反応速度は2倍から3倍になるわけである．ところが，休眠中の動物はQ10が大きくなることが知られている（Geiser., 2004）．このことは，代謝の低下度合いは，温度の低下から予想される影響よりも大きいことを意味する．以上のことから，休眠中の動物は，体温が低下したから代謝が低下したのではなく，代謝が低下したから体温が低下しているのである．

我々の研究グループでは，日内休眠をする動物であるマウス（ハツカネズミ）をモデル哺乳類とした休眠研究を行っている．実験動物として確立され，豊富なゲノムリソースを活用できるマウスの日内休眠を研究することによって，冬眠と共通する普遍的な能動的低代謝のメカニズムを解明できる可能性がある．2016年にマウスの日内休眠を再現良く誘導する方法を確立し，C57BL/6Jという系統のマウスは絶食を開始すると16時間前後で安定的に日内休眠に入ることを見出した（図1）（Sunagawa et al., 2016）．この絶食性休眠（FIT；fasting-induced torpor）の安定した誘導法を用いてマウスの日内休眠時の体温制御のパラメータを調べたところ，日内休眠中のマウスは低代謝にはなるものの，体温制御機構の設定温度（体温セットポイント）が37℃から低下していない点が冬眠動物とは異なることを明らかにした．一方で，休眠中の温度制御機構を調べたところ，外気温度と体温の差を埋めようとする度合い（熱産生感度）が冬眠動物と同様に低下しているということが判明した．2021年には，遺伝子の転写開始点をゲノムワイドに同定できるトランスクリプトーム手法であるCAGE法に

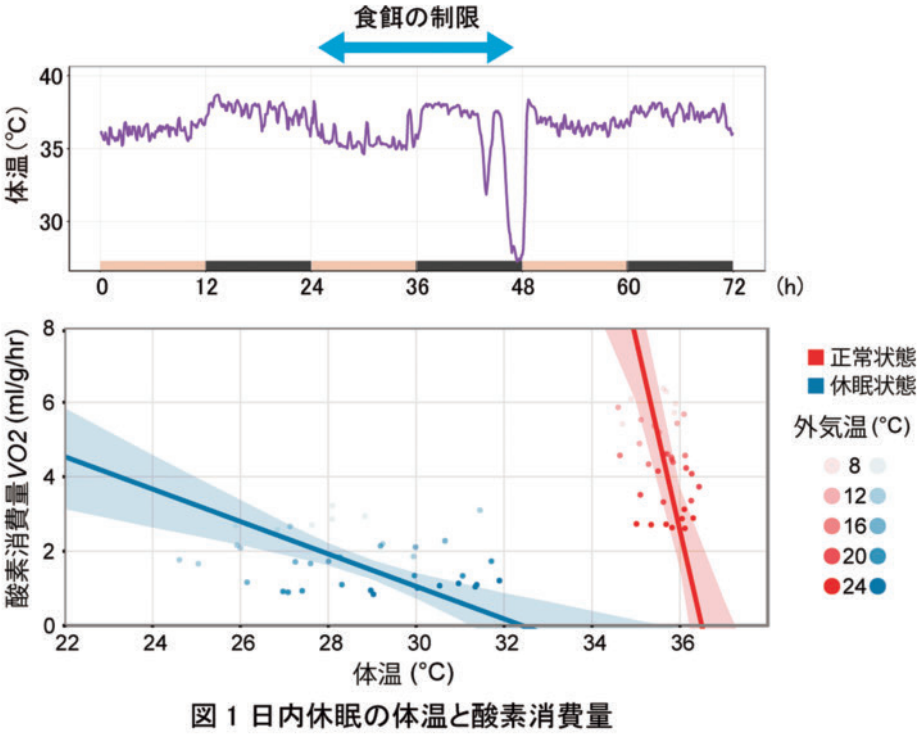


図 1 日内休眠の体温と酸素消費量

図 1：冬眠と日内休眠
日内休眠は絶食などの状況に応じて 1 日の中で数時間だけ休眠することである（上）日内休眠中の酸素消費量と体温のプロット．体温，酸素消費量，外気温を含む数理モデルにデータをフィッティングすると直線の傾きは熱産生感度を反映し，x 軸との切片は体温のセットポイントになる．（下）．

よって，骨格筋において「日内休眠の間にだけ発現が変化」し，かつ「低代謝状態に特異的」な遺伝子群を同定した．これら遺伝子群のプロモーター領域における転写因子モチーフを調べたところ ATF3 の結合配列が多く含まれていることが分かった（Deviatiiarov et al., 2021）．そこで ATF3 ノックアウトマウスを作製し，日内休眠の表現型を解析したところ，低代謝状態への移行が正常マウスに比べて穏やかであることを確認した．このように実験的に誘導できるマウスの日内休眠は，能動的低代謝の研究に極めて強力な実験系であることが分かる．

3．休眠の中枢制御基盤

休眠の目的は，環境に適応するために全身を低代謝・低体温にすることである．したがって，動物の内的環境（栄養状態や体温）と外的環境（温度や長日リズムなど）の変化を知覚・統合したシグナルを，効果器である全身の細胞へ伝達する仕組みを有するはずである．このような制御システムは中枢神経系である脳を中心に形成されていると考えられる．特に，視床下部は温感冷感の感覚シグナルや，末梢のエネルギー代謝情報を統合し，中枢神経系の他領域や自律神経系を調節していることから，古くから休眠との関係が指摘されてきた．そこで，視床下部を中心として，体温調節や休眠誘導についての知見を概説する．

視床下部視索前野（Preoptic area：POA）に局在し，PACAP（Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide：*Adcyap1* 遺伝子の産物）および BDNF を共発現する神経細胞群は，暑熱環境下で興奮し低体温誘導能をもつ（Tan et al., 2016）．これらは，暑熱感知ニューロン（Warm-sensitive neurons）とされており，実際にこれらを光遺伝学により興奮性操作すると，褐色脂肪熱産生の抑制，熱放散の促進，33℃前後への体温の低下が生じる．また重要なことに，同じく視索前野には脳組織自体の温度上昇を直接感知して発火活動が上昇する暑熱感知ニューロンが存在し（Nakayama et al, 1961），これによって深部体温を反映した体温調節を実現していると考えられているが，*Adcyap1*/*Bdnf* ニューロンに脳温度感受性は見られなかった．したがって，視索前野の *Adcyap1*/*Bdnf* ニューロンは皮膚からの温覚の入力に反応して，体温を通常域に戻すためのネガティブフィードバック機構に関わるニューロン群であると考えられている．近年，神経活動依存的な神経細胞ラベル技術（FOS-TRAP 法；Allen et al., 2017）と単核 RNAseq により，

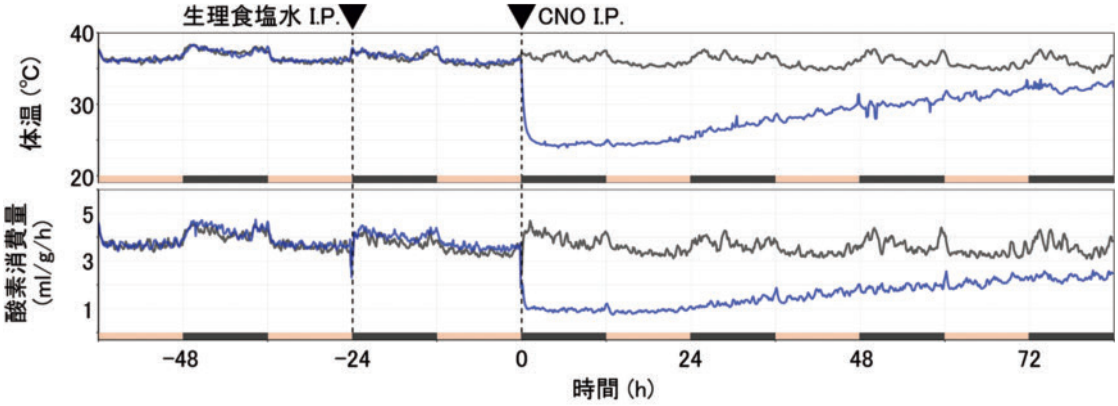


図 2：Q 神経誘導性低代謝（QIH）
マウスの視床下部前腹側脳室周囲核に存在する Qrfp 発現ニューロン（Q 神経）を特異的に興奮させると，数日間に渡る低代謝・低体温を誘導できる．神経細胞に人工受容体である化学遺伝学受容体を発現させると，CNO（クロザピン-N-オキシド）という薬剤が受容体に結合することで神経活動を興奮させる（スイッチオン）ことが可能である．Q 神経に化学遺伝学受容体を発現させて，CNO で興奮させると酸素消費量の低下が始まり，続けて体温が低下する．

Adcyap1^{+}の興奮性ニューロンがマウスの日内休眠に関与するという報告がされた（Hrvatin et al., 2020）．実際に，*Adcyap1*$^{+}$ニューロンを抑制すると，絶食による日内休眠の正常な発現が阻害された．さらにファイバーフォトメトリーにより PACAP ニューロンは日内休眠中に強く活動することも示された．これは，生理的な温度制御に関わるニューロンが，日内休眠の誘導あるいは維持にも働くことを示唆している．

温度受容体である TRPM2 チャネル（齋藤の稿参照）を発現する視索前野の神経細胞群が暑熱感受性を持つことも報告されている（Song et al., 2016）．化学遺伝学を用いて TRPM2 陽性ニューロンを人為的に興奮させると，マウスの体温が数時間に 10℃ 程度低下する．TRPM2 は 37℃ 以上の温度で活性化する温度感受性のカルシウム透過性イオンチャネルであるため，中枢における温覚検知の分子機構として考えられる．しかし，TRPM2 欠損マウスの体温調節に異常がないことから，未知の暑熱感受性ニューロンが存在する可能性が高い．

また，視索前野には内因性の代謝・体温調節因子の受容体や非視覚性光受容体を発現する神経細胞も多く位置している．このなかにはレプチン受容体（*LepRb*）（Yu et al., 2016），プロスタグランジン受容体 EP3R（*Ptger3*）（Machado et al., 2020），エストロゲン受容体（*EsR1*）（Zhang et al., 2020），ニューロキニン受容体（*NK3R*）（Mittelman-Smith et al., 2015），オプシン 5 受容体（*Opn5*）（Zhang et al., 2020）が含まれており，いずれの遺伝子を発現する細胞であっても化学遺伝学や光遺伝学で特異的に興奮させることによって低体温が誘発される．このうち，エストロゲン受容体 EsR1 を発現するニューロンの活動を抑制すると，絶食による日内休眠の正常な発現も阻害されたことから，日内休眠の誘導にも関与してると考えられる（Zhang et al., 2020）．

近年，我々の研究チームではマウスの視床下部視索前野のうち，内側部・前腹側脳室周囲核（AvPe, anteroventral periventricular nucleus）および内側視索前野（MPA, medial preoptic area）に存在し，QRFP（pyroglutamylated RFamide peptide）という神経ペプチドを発現するニューロン群を特異的に興奮させると数日にわたる持続的な低体温・低代謝が誘導されることを発見した（Takahashi et al., 2020）（図 2）．QRFP には食餌量や体温を上昇させる作用があるため，この発見は予想外であった（Chartrel et al., 2003; Takayasu et al., 2006）．おそらく QRFP ではない未知の因子が低体温・低代謝に関わっていると思われる．これらのニューロン群を Q ニューロン（Q neurons；Quiescence-inducing neurons：休眠誘導神経），Q ニューロンを人工的に興奮させることにより生じる低代謝を QIH（Q neurons-induced hypometabolism）と名付けた．QIH の際立った特徴として，体温セットポイントの低下がある．通常のマウスは 37℃ に体温を保とうとするが，QIH 中のセットポイントは正常よりも約 9℃ 低下していた．（図 3）．「低代謝」および「体温セットポイント低下」というこれら二つの特徴の共存は，冬眠中の冬眠動物においてのみ報告されている．したがって，QIH は冬眠に似た低代謝・低体温状態であることが示唆された．また，QRFP は哺乳類に広く保存されており，Q ニューロンは哺乳類に広く保存された，緊急時に作動する低代謝誘導神経である可能性がある．今後，Q ニューロンの制御システムが明らかにな

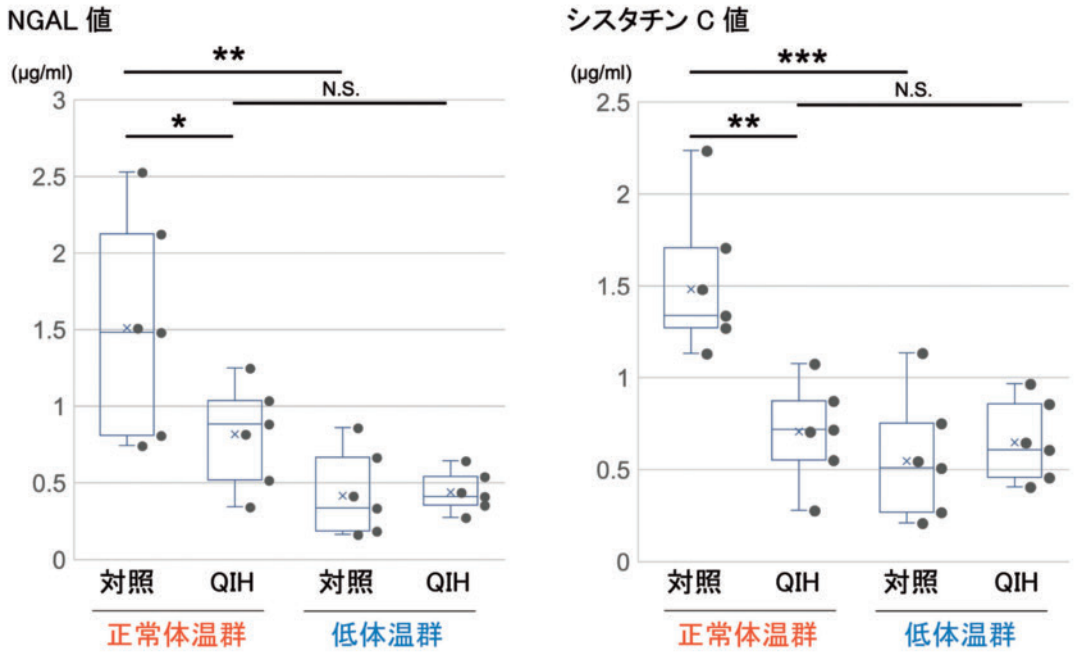


図 3：温かい休眠による腎臓障害の進行抑制
体周囲の温度を制御することで正常体温群（35.0±1.3℃）と低体温群（21.5±1.3℃）に分け，虚血誘導後に急性腎障害の高感度バイオマーカーである NGAL 値とシスタチン C 値を評価した．正常体温群において QIH マウスでは対照マウスよりも有意に低い値を示し，QIH マウス同士では正常体温群と低体温群の間には有意な差は認められなかった．

ることにより休眠の誘導機構への解明が期待される．

これまでに述べた神経細胞種は，視索前野のうち前腹側に多くみとめられ，多くはオーバーラップしていると考えられる．したがって，本質的に体温制御と日内休眠に関わるシステムは視床下部視索前野に存在しており，複数の因子によって調節されていると考えられる．今後は，調節因子の多様性を記述する方向だけでなく，より中心的かつ本質的な役割をする細胞種を同定する方向の研究も期待される．

4．休眠の医療応用：人工冬眠

生体内外の環境変化にかかわらず生体の状態が一定に保たれるという性質を恒常性の維持と呼ぶ．生体が「健康」な状態においては，細胞レベルでエネルギー必要量と供給量の均衡を保つことで，恒常性を維持している．一方，身体的負荷がかかり恒常性を乱れた状態を「病気」という．例えば，肺炎であれば体内に取り込む酸素が低下するために十分に食物を酸化できないためエネルギーを取り出せなくなり，結果として末梢組織に十分なエネルギーを供給できなくなる．あるいは心筋梗塞であれば血圧が低下するため，末梢組織に酸素を運搬できなくなった状態であり，末梢組織におけるエネルギー供給が障害される．このように，エネルギー必要量に対して供給量が不足しているときに，休眠によってエネルギー必要量を低下させることでエネルギーの不均衡を是正できると考えられる．これによって，病気の進行が遅れることで，治療が有効な時間枠を延長させることが期待される．病院までたどりつけない患者，あるいは治療に意味があるタイムリミットまでに治療を開始できない患者，このような患者が救命できる可能性が広がる．

我々の研究グループは，循環停止を伴う大動脈手術のモデルを用いて，休眠の医療応用の可能性を検討した（Kyo et al., 2022）．動脈手術など血液の循環停止を必要とする手術においては，術中臓器虚血による術後臓器の機能不全が問題となる．臨床現場では，超低体温（＜20℃）による低代謝の誘導が循環停止中の臓器保護に用いられているが，低体温による術後の凝固障害や血小板機能障害のリスクがある．そこで，循環停止を伴う大動脈手術を模したマウスを用いて，超低体温に代わる低代謝誘導として QIH の有用性を検討したところ，QIH を施したマウスの腎障害は低体温と同程度まで抑制されることが判明した．さらに，環境温度を 36℃に上げて，正常体温（35.0±1.3℃）に近づけた QIH であっても腎臓障害を抑制することができた．これは休眠による低代謝が，腎臓のエネルギー需要を下げたことで，血液の循環

停止に伴うエネルギー供給不足から保護された結果と考えられる．

今後は急性疾患だけではなく，うつ病などの精神疾患への有用性も検証されるべきである．例えば，労働者のうつ病では一定期間の休養によって抑うつ症状が急速に寛解に向かうため，“休養”が治療の第一選択である．休養はこころの休息という意味だけではなく，ミスマッチしている環境との調整をする時間でもある．しかしながら，休養中であってもストレス源から心理的な距離を取れず，不安や焦燥感を抱えたままとなってしまい，十分な精神的な休養が成立しない場合がある．また，実社会においては休養によって収入が減少することを鑑みると，休養自体にコストが発生してしまうことになり，経済的な理由から休養を選択できないケースも散見される．このような状況で，人工冬眠を選択することができれば，不安や焦燥を感じることなく休眠しながら環境調整を行い，また休眠中の生命維持にかかる経済的コストも削減することができるかもしれない．このような“人生からのログアウト”によって，複雑でストレスフルな現代社会を乗り切る考え方が出てくる可能性がある．このように人工冬眠が切り開く新しい医療は，多くの可能性に満ちており，病態に依存しない幅広い適応が期待される．

5．休眠研究にある問いと方向性

休眠研究は 100 年以上前に学術誌に登場して以来，生態学や生理学の領域においては多くの知見が集められてきた．しかし，休眠の誘導に伴って細胞状態がどのように遷移するのか，低代謝耐性・低温耐性がどのように細胞に実装されているのか，といった多くの問いが手つかずのまま残されている．そこで，以下では休眠研究が抱える難しさを共有しながら，どのような方向性があり得るのかという点について概説する．

a．仮説検証型研究の推進

これまでに冬眠動物をモデルとしたオミクス解析（トランスクリプトーム，プロテオーム，メタボローム）が行われ，休眠を含む低代謝状態と相関のある分子が発見されているが，その分子が休眠の表現型にどのように関与するのかは不明である（Andrew., 2019）．一般に，分子と表現型の因果性を示すためには，対象とする分子への遺伝子改変や薬理実験を行い，それによる表現型の変化を観察する仮説検証型の実験をする必要がある．休眠研究の場合，動物が冬眠に入るまでに数ヶ月単位の時間を要することや，日内休眠の状態としての不安定さのために仮説検証型の実験を実施することが困難であった．しかし，上述のように Q ニューロンの活性化による冬眠様状態の誘導や，安定的な日内休眠誘導プロトコルの確立によって，ようやく休眠研究が仮説検証型の研究を推進できる分野になったといえる．

b．冬眠動物に適応可能な技術開発

冬眠は日内休眠と相同性が高い現象ではあるが，持続時間や低代謝・低体温の深さに関しては歴然とした相違がある．したがって，休眠を理解し人工冬眠につなげるためには冬眠を扱った仮説検証型の研究が必要不可欠である．しかし，実験室環境下で飼育可能な冬眠動物であるゴールデンハムスターやジリスに適応可能な遺伝学・分子生物学のツールが限られていることが，仮説検証型の実験を遂行するうえでの課題となっている．この課題をクリアするために，冬眠動物を用いたゲノム編集技術の開発や，ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の整備を進めていくことが重要である．

c．細胞レベルの休眠実験系の樹立

休眠は個体レベルの表現型であるため，いかに研究ツールが整備されようとも仮説検証のスループットやスケーラビリティの低さは課題である．一方で，概日リズムにおける培養細胞でのアッセイ系（Balsalobre et al., 1998）や，老化における細胞老化の分子マーカー発見（Krishnamurthy et al., 2004）の例から分かるように，個体レベルの表現型を細胞レベルの表現型に落とし込むことは分野の発展に大きく寄与することになる．つまり，休眠も細胞レベルに落とし込むことができれば，あらゆる分子生物学的ツールが適応できるようになり，一挙に分子メカニズムの解明が進展すると思われる．幸いなことに，休眠中は全身の細胞が低代謝になっていると予想され，また代謝自体が細胞レベルで定義・観測可能な量であるため，“細胞休眠”は十分に実現できると思われる．今後は，例えば休眠状態を反映する細胞の分子マーカーの同定や，それに基づく細胞状態の標識・摂動技術を開発することで，細胞レベルの休眠誘導や，低代謝耐性・低温耐性の分子メカニズムの解明が進展すると期待できる．

参考文献

Allen, W. E., DeNardo, L. A., Chen, M. Z., Liu, C. D., Loh, K. M., Fenno, L. E., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., & Luo, L.

(2017). Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive. *Science*, **357**(6356), 1149–1155.

Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**(6), 929–937.

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., Beauvillain, J.-C., & Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(25), 15247–15252.

Deviatiiarov, R., Ishikawa, K., Gazizova, G., Abe, T., Kiyonari, H., Takahashi, M., Gusev, O., & Sunagawa, G. A. (2021). Integrative transcription start site analysis and physiological phenotyping reveal torpor-specific expression program in mouse skeletal muscle. *Communications Biology*, **4**(1), 1290.

Geiser, F. (1998). Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: importance of body size. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, **25**(9), 736–739.

Glasstone, S. (1962). Textbook of Physical Chemistry, Macmilllan and Co. *Limited, London*.

Heldmaier, G., Ortmann, S., & Elvert, R. (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **141**(3), 317–329.

Hrvatin, S., Sun, S., Wilcox, O. F., Yao, H., Lavin-Peter, A. J., Cicconet, M., Assad, E. G., Palmer, M. E., Aronson, S., Banks, A. S., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2020). Neurons that regulate mouse torpor. *Nature*, **583**(7814), 115–121.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of Clinical Investigation*, **114**(9), 1299–1307.

Kyo, S., Murata, K., Kawatou, M., Minatoya, K., Sunagawa, G. A., & Masumoto, H. (2022). Quiescence-inducing neurons-induced hypometabolism ameliorates acute kidney injury in a mouse model mimicking cardiovascular surgery requiring circulatory arrest. *JTCVS Open*. https://doi.org/10.1016/j.xjon.2022.11.001

Machado, N. L. S., Bandaru, S. S., Abbott, S. B. G., & Saper, C. B. (2020). EP3R-Expressing Glutamatergic Preoptic Neurons Mediate Inflammatory Fever. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **40**(12), 2573–2588.

Mittelman-Smith, M. A., Krajewski-Hall, S. J., McMullen, N. T., & Rance, N. E. (2015). Neurokinin 3 Receptor-Expressing Neurons in the Median Preoptic Nucleus Modulate Heat-Dissipation Effectors in the Female Rat. *Endocrinology*, **156**(7), 2552–2562.

Mohr, S. M., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Adaptations of Hibernation: The Solution to Environmental Challenges. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **36**, 315–338.

Nakayama, T., Eisenman, J. S., & Hardy, J. D. (1961). Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating. *Science*, **134**(3478), 560–561.

Song, K., Wang, H., Kamm, G. B., Pohle, J., Reis, F. de C., Heppenstall, P., Wende, H., & Siemens, J. (2016). The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science*, **353**(6306), 1393–1398.

Sunagawa, G. A., & Takahashi, M. (2016). Hypometabolism during Daily Torpor in Mice is Dominated by Reduction in the Sensitivity of the Thermoregulatory System. *Scientific Reports*, **6**, 37011.

Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S. C., Iguchi, H., Kawasawa, Y. I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., Ohno, K., Ioka, R. X., Murakami, S., Dohmae, N., Xie, J., Suda, T., Motoike, T., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., & Sakai, J. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(19), 7438–7443.

Tan, C. L., Cooke, E. K., Leib, D. E., Lin, Y.-C., Daly, G. E., Zimmerman, C. A., & Knight, Z. A. (2016). Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. *Cell*, **167**(1), 47–59.e15.

Yu, S., Qualls-Creekmore, E., Rezai-Zadeh, K., Jiang, Y., Berthoud, H.-R., Morrison, C. D., Derbenev, A. V., Zsombok, A., & Münzberg, H. (2016). Glutamatergic Preoptic Area Neurons That Express Leptin Receptors Drive Temperature-Dependent Body Weight Homeostasis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **36**(18), 5034–5046.

Zhang, K. X., D'Souza, S., Upton, B. A., Kernodle, S., Vemaraju, S., Nayak, G., Gaitonde, K. D., Holt, A. L., Linne, C. D., Smith, A. N., Petts, N. T., Batie, M., Mukherjee, R., Tiwari, D., Buhr, E. D., Van Gelder, R. N., Gross, C., Sweeney, A., Sanchez-Gurmaches, J., … Lang, R. A. (2020). Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. *Nature*, **585**(7825), 420–425.

Zhang, Z., Reis, F. M. C. V., He, Y., Park, J. W., DiVittorio, J. R., Sivakumar, N., van Veen, J. E., Maesta-Pereira, S., Shum, M., Nichols, I., Massa, M. G., Anderson, S., Paul, K., Liesa, M., Ajijola, O. A., Xu, Y., Adhikari, A., & Correa, S. M. (2020). Estrogen-sensitive medial preoptic area neurons coordinate torpor in mice. *Nature Communications*, **11**(1), 6378.

低温科学 81 （2023） 149–158
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 149

シリアンハムスターの冬眠を制御する中枢神経機構

渡邊　正知[1)]，田村　豊[2)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 7 日受理

シリアンハムスター（*Mesocricetus auratus*）は，寒冷・短日環境下で 1ヶ月以上飼育すると環境温度付近（6℃）まで体温を低下させ冬眠を始める（導入期）．その後，数日間の非活動期（維持期）を経て，再び自力で正常体温まで覚醒する（覚醒期）．冬眠期間中はこの数日間の低体温期と中途覚醒を何度も繰り返す．我々はこれまでに，冬眠導入期・維持期・覚醒期の体温は，それぞれ，A_1 受容体を介したアデノシン系・μ_1 受容体を介したオピオイド系・R1 受容体を介した TRH 系の別々の中枢神経機構により制御されていることを明らかにしてきた．本稿ではそれぞれの体温制御機構を解説する．

Central thermoregulatory mechanisms of hibernation in Syrian hamsters

Masatomo Watanabe[1] and Yutaka Tamura[2]

Hibernation induced in Syrian hamsters by housing them in winter condition (L:D 8:16, T_a = 5℃) was confirmed by marked reductions in the body temperature (T_b) and respiratory rate. A hibernation bout of Syrian hamsters could be divided into entrance, maintenance and arousal phases according to changes in T_b. In the entrance phase, the adenosine system mediated by activating A_1 receptors lowered T_b. During the maintenance phase, β-endorphin which synthesizes in the arcuate nucleus related with sustenance of depressed T_b by activating μ-opioid receptors. In the arousal phase, the central thyrotropin-releasing hormone (TRH) system mediated by R1 receptor induced elevation of T_b. TRH-R1 activated non-shivering thermogenesis in brown adipose tissue via sympathetic nerve stimulation. In this paper, we review their thermoregulatory mechanisms in hibernating hamster.

キーワード：冬眠，体温，アデノシン，オピオイド，甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）
hibernation, body temperature, adenosine, opioid, thyrotropin releasing hormone

条件的冬眠動物と位置付けられるシリアンハムスター（*Mesocricetus auratus*，以下ハムスターと略）は，寒冷・短日（当研究室では，環境温度 5℃，明期 8 時間，暗期 16 時間）環境下で 1ヶ月以上飼育すると体温を低下させ冬眠を始める（図 1-A）．冬眠導入時，ハムスターの体温は 21.4±0.3 時間かけて外気温＋1℃ 程度まで低下する（冬眠導入期）．その後 36～112 時間低体温を維持し（冬眠維持期），3.3±0.3 時間で正常体温まで一気に復温する（覚醒期）（図 1-B）．冬眠期間中はこの数日間の低体温期と中途覚醒を何度も繰り返す．本稿では，我々がこれまでに明らかにしてきた，中枢神経系を介したハムスターの冬眠時の体温調節機構を紹介する．

1．冬眠導入期の体温制御機構

アデノシンが A_1 受容体を介しラットやマウスあるい

連絡先
渡邊　正知
福山大学薬学部薬理学研究室
〒729-0292　広島県福山市学園町 1 番地三蔵
Tel. 084-936-2112（代）
e-mail：watanabe@fukuyama-u.ac.jp
1）福山大学薬学部薬理学研究室
Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, 1 Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan
2）福山大学薬学部薬理学研究室
Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, 1 Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

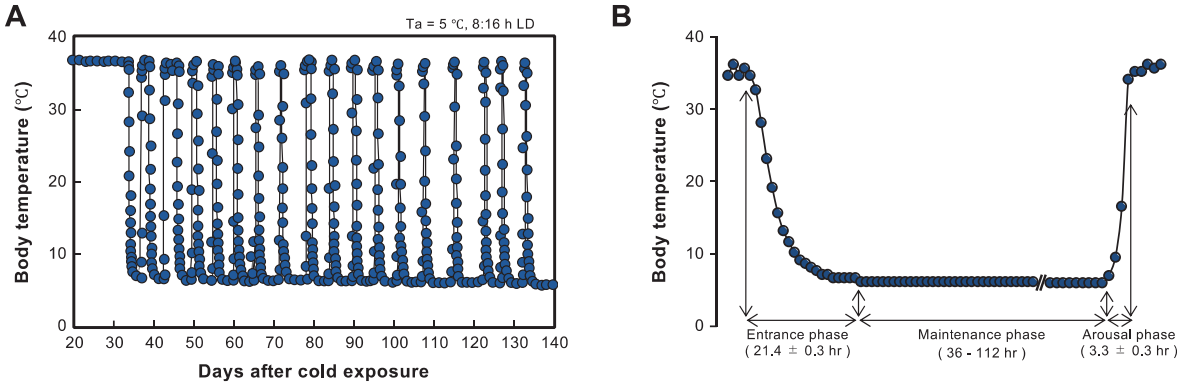


図 1：シリアンハムスターの冬眠時の体温変化
（A）寒冷（Ta ＝ 5℃）・短日（8:16 h light-dark cycle）環境曝露後のハムスターの代表的な体温変化を示す．（B）冬眠期におけるハムスターの体温変化を示す．

はウサギの体温を低下させること（Ticho and Radulovacki, 1991; Anderson et al., 1994; Matuszek and Gagalo, 1996）や，A_1 受容体が体温調節中枢の視床下部を含む脳広域に分布していること（Fastbom et al., 1987），さらに，アデノシン A_1 受容体が冬眠期のジリスにおいて増加していること（Lee et al., 1993）から，ハムスターの冬眠時の体温制御においてもアデノシンの関与が示唆された．

そこで，ハムスターの体温に対するアデノシンの影響を明らかにするために，冬眠していない非冬眠ハムスターにアデノシンおよびその供与体となりうるアデニンヌクレオチド（AMP，ADP，ATP）を側脳室から投与し，寒冷 5℃環境下に置いた際の体温への影響を検討した（Tamura et al., 2005）．アデノシン（ADO，400 nmol）は，非冬眠ハムスターの体温を 5.2±0.4℃一過性に低下させた（図 2-A）．また，アデノシンによる体温低下は，A_1 受容体アンタゴニスト（cyclopentyltheophylline：CPT，3 nmol）により抑制され，A_2 受容体アンタゴニスト（3,7-dimetyl-1-propargylxanthine：DMPX，3 nmol）によって抑制されなかった（図 2-B）．これらの結果から，アデノシンによる体温低下は A_1 受容体を介して誘導されることが明らかとなった．一方，各アデニンヌクレオチド（400 nmol）もアデノシン同様に，非冬眠ハムスターの体温を低下させた（図 2-A）．しかし，ATP による体温低下は，P_2 受容体（ATP 受容体）非選択的アンタゴニスト（Suramine，2 nmol）では抑制されず，CPT によって抑制された．これらの結果から，アデニンヌクレオチドはヌクレオチドで作用するのではなく，ecto-enzyme によって代謝され（Fields and Burnstock, 2006; Freissmuth and Klotz, 2017），アデノシンとして P_1 受容体のサブタイプ A_1 を介して体温低下を誘導することが示唆された．

さらにアデノシンによる体温低下機構の詳細を解析した（Shintani et al., 2005a）．異なる環境温度下にてアデノシン A_1 受容体アゴニスト（N^6-cyclohexyladenosine：CHA，0.5 nmol）を非冬眠ハムスターの側脳室に投与すると，環境温度に依存した体温低下が認められた（図 2-C）．また，CHA 誘導体温低下時には，体温が低下した際に通常みられる骨格筋のふるえ熱産生は観察されなかった．次に，視床下部の各部位に 0.3 nmol CHA を微量投与しアデノシンの作用部位を同定した（図 2-D）．前視床下部（anterior hypothalamus：AH）が最も CHA の影響を受ける部位であることが明らかとなった（−7.32±0.92℃）．また，熱産生系の中枢となる背内側部（dorsomedial hypothalamus：DMH）における体温低下作用は，前視床下部よりも有意に少なかった（−0.92±0.32℃）．プレシナプスに存在する A_1 受容体は，$G_{i/o}$ を介し神経伝達を抑制する（Haas and Selbach, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001）．また，視索前野/前視床下部（preoptic/anterior hypothalamus：PO/AH）には熱産生抑制神経系の存在が報告されている（Nakamura, 2011; Szymusiak, 2018）ことなどから，アデノシンは，背内側部を介した熱産生系を直接阻害するよりも，熱産生抑制神経系を脱抑制することで非冬眠ハムスターの体温低下を誘導することが示唆された．

次に，冬眠時の体温低下におけるアデノシンの関与を明らかにするために，冬眠ハムスターに P_1 受容体アンタゴニストを投与しその影響を検討した（Tamura et al., 2005）．冬眠導入期（冬眠開始 17 時間後）に選択的 A_1 受容体アンタゴニストの CPT（3 nmol）を側脳室から投与すると体温が上昇し冬眠は中断されたが，A_2 受容体アンタゴニスト DMPX（3 nmol）では体温変化は認められず冬眠が継続した（図 2-E）．興味深いことに，CPT 投与により覚醒が誘導された個体の割合は，冬眠開始 17 時間を超えると徐々に減少し，冬眠維持期にあたる冬眠

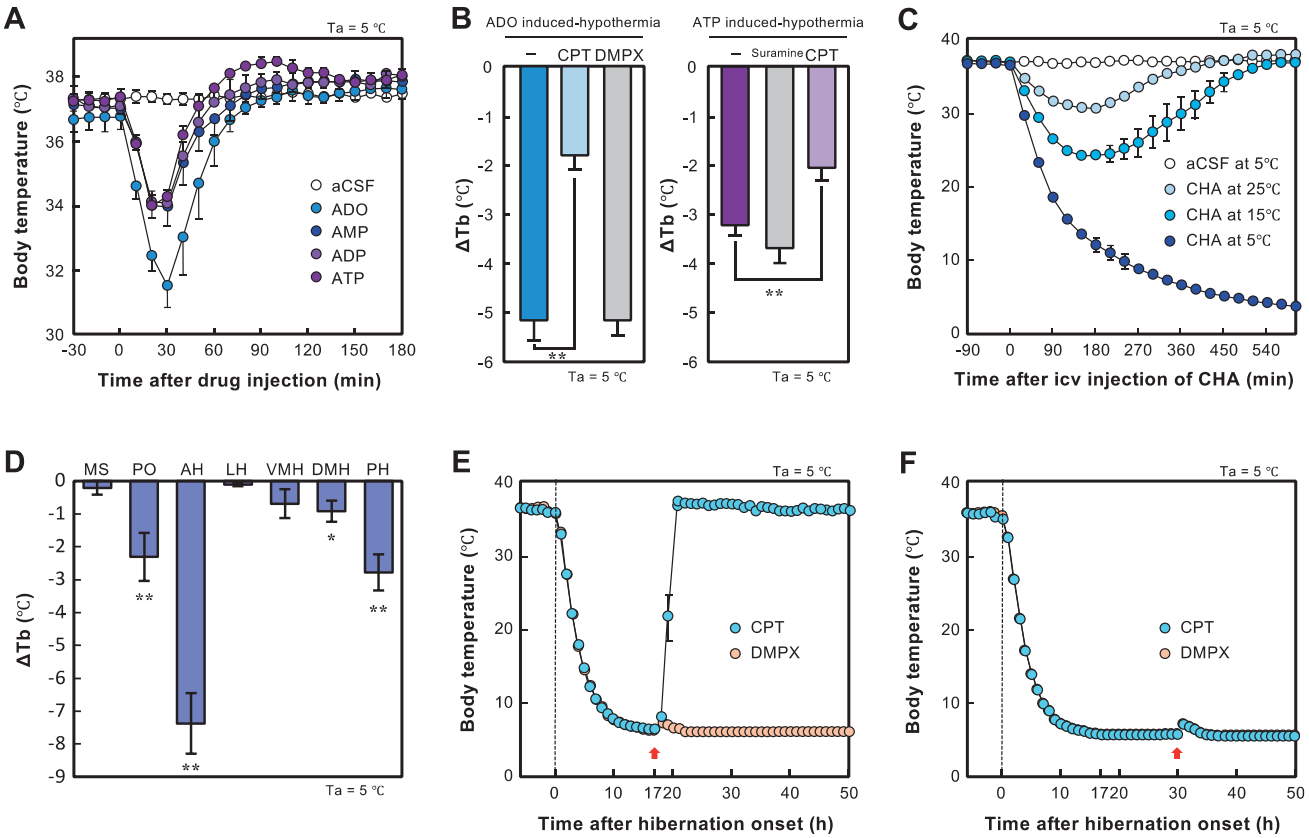


図 2：冬眠導入期の体温制御におけるアデノシンの作用（Tamura ら（2005），Shintani ら（2005a）より引用/一部改変）
（A）非冬眠ハムスターの体温に対するアデノシンの影響．外気温（Ta）5℃の寒冷環境に 3 時間順化させたのち，人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid：aCSF ○），アデノシン（ADO ●）および各アデニンヌクレオチド（ADP ●，AMP ●，ATP ●）400 nmol を側脳室から投与し深部体温を測定した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（B）アデノシン/ATP 誘導低体温に対するアデノシン受容体アンタゴニストの影響．**非冬眠ハムスターに ADO（400 nmol）もしくは ATP（400 nmol）を側脳室から投与し低体温を誘導した．cyclopentyltheophylline（CPT，3 nmol），3,7-dimetyl-1-propargylxanthin（DMPX，3 nmol），Suramine（2 nmol）はいずれも低体温誘導前に側脳室から投与した．各データは深部体温の変化（ΔTb）を平均±SEM で示した（n＝6）．$^{**}P<0.01$ **（C）A_1 受容体アゴニスト誘導低体温に対する環境温度の影響．**各環境温度（Ta＝5℃ ●，15℃ ●，25℃ ●）に順化させたのち，非冬眠ハムスターに N^6-cyclohexyladenosine（CHA，0.5 nmol）を側脳室から投与し深部体温を測定した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（D）A_1 受容体アゴニストの脳内作用部位．**非冬眠ハムスターの視床下部の各部位（medial septum：MS，preoptic area：PO，anterior hypothalamus：AH，lateral hypothalamus：LH，ventromedial hypothalamus：VMH，dorsomedial hypothalamus：DMH，posterior hypothalamus：PH）に CHA（0.3 nmol）を微量投与し深部体温を測定した．各データは体温変化（ΔTb）を平均±SEM で示した（n＝6）．$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ **（E）冬眠導入期の低体温に対するアデノシン受容体アンタゴニストの影響．**冬眠開始 17 時間後に，CPT（●，3 nmol）もしくは DMPX（●，3 nmol）を側脳室から投与し，深部体温に対する影響を検討した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（F）冬眠維持期の低体温に対するアデノシン受容体アンタゴニストの影響．**冬眠開始 30 時間後に，CPT（●，3 nmol）もしくは DMPX（●，3 nmol）を側脳室から投与し，深部体温に対する影響を検討した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．

開始 30 時間後では CPT による覚醒は認められなかった（図 2-F）．これらの結果から，冬眠導入期の低体温は，A_1 受容体を介したアデノシン系によって誘導されることが明らかとなった．アデノシン系による体温制御は，ジリスの季節性冬眠（Jinka et al., 2011）でも報告されており，低体温誘導の中心的な役割を担っていることが推測される．また，A_1 受容体を介したアデノシン刺激は，覚醒を制御する外側視床下部（lateral hypothalamus：LH）のオレキシン神経系を抑制することが報告されている（Liu and Gao, 2007; Thakkar et al., 2008）．このことは，冬眠導入にはアデノシンが体温を低下させるとともに，覚醒系を抑制することにより冬眠が開始することを示唆する．

2. 冬眠維持期の体温制御機構

前項（図 2-F）に示すように，ハムスターの冬眠維持期はアデノシンとは異なる別の体温制御系によって調節されていることが示唆された．オピオイドが体温を低下させること（Handler et al., 1994; Baker and Meert., 2002）や，オピオイド受容体アゴニストを非冬眠期のジリスに慢性投与すると冬眠が誘導されること（Oeltgen et al.,

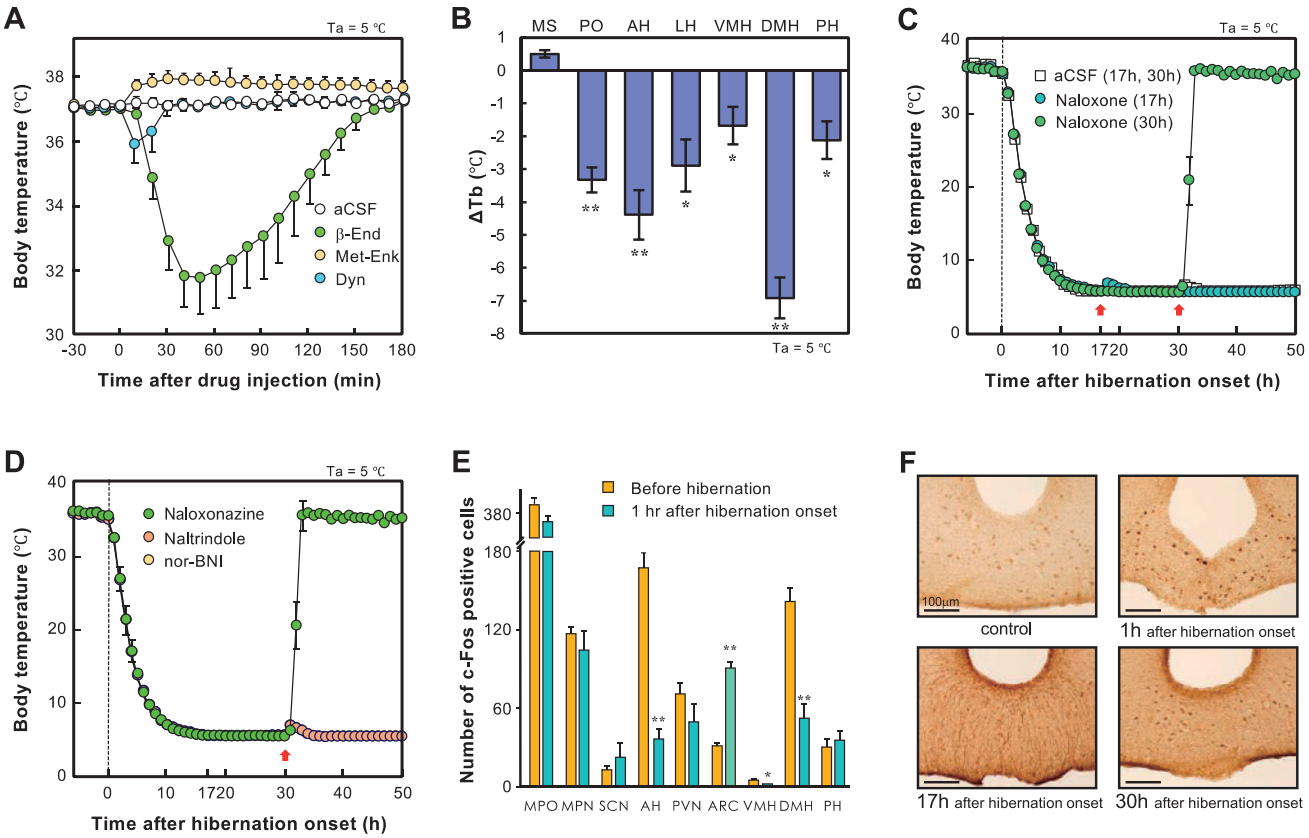


図 3：冬眠維持期の体温制御におけるオピオイドの作用（Tamura ら（2005，2012）より引用/一部改変）
（A）非冬眠ハムスターの体温に対するオピオイドの影響．外気温（Ta）5℃の寒冷環境に 3 時間順化させたのち，aCSF（○），β-endorphin（β-End ●，0.1 nmol），Met-enkephalin（Met-Enk ●，10 nmol）および Dynorphin A（Dyn ●，10 nmol）を側脳室からそれぞれ投与し深部体温を測定した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（B）μ 受容体アゴニストの脳内作用部位．**非冬眠ハムスターの視床下部の各部位（medial septum：MS，preoptic area：PO，anterior hypothalamus：AH，lateral hypothalamus：LH，ventromedial hypothalamus：VMH，dorsomedial hypothalamus：DMH，posterior hypothalamus：PH）に［D-Ala^2, N-MePhe^4, Gly-ol］-enkephalin（DAMGO，0.3 nmol）を微量投与し深部体温を測定した．各データは体温変化（ΔTb）を平均±SEM で示した（n＝6）．$*P<0.05$，$**P<0.01$ **（C）冬眠時の低体温に対するオピオイド受容体アンタゴニストの影響．**冬眠開始 17 時間後（●）もしくは 30 時間後（●）に，naloxone（10 nmol）を側脳室から投与し，深部体温に対する影響を検討した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（D）冬眠維持期の低体温に対する選択的オピオイド受容体アンタゴニストの影響．**冬眠開始 30 時間後に，Naloxonazine（●，10 nmol），Naltrindole（●，10 nmol）もしくは nor-Binaltorphimine（nor-BNI ●，10 nmol）を側脳室から投与し，深部体温に対する影響を検討した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（E）視床下部における冬眠開始後の神経活動の変化．**前冬眠期（before hibernation）および冬眠開始 1 時間後の視床下部各部位（medial preoptic area：MPO，medial preoptic nucleus：MPN，suprachiasmatic nucleus：SCN，anterior hypothalamus：AH，paraventricular nucleus：PVN，arcuate nucleus：ARC，ventromedial hypothalamus：VMH，dorsomedial hypothalamus：DMH，posterior hypothalamus：PH）における抗 c-Fos 抗体陽性細胞数を定量した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．$*P<0.05$，$**P<0.01$ **（F）冬眠時の弓状核における β-endorphin の変化．**常温で飼育したハムスター（control），および冬眠開始 1 時間後，17 時間後，30 時間後それぞれのハムスターの脳組織切片を作成し，抗 β-endorphin 抗体を用いて免疫組織染色を行った．

1988），さらに脳室内への非選択的オピオイド受容体アンタゴニストの持続投与によりジリスの冬眠維持期間が短縮すること（Beckman and Llados-Eckman, 1985）などから，冬眠ハムスターの低体温維持におけるオピオイドの関与が推測された．

そこで，ハムスターの体温に対するオピオイドの影響を明らかにするために，非冬眠ハムスターにオピオイド受容体アゴニストを側脳室から投与し体温への影響を検討した（Tamura et al., 2005, 2012）．β-endorphin（0.1 nmol，μ 受容体アゴニスト）は一過性の体温低下を誘導したが，Met-enkephalin（10 nmol，δ 受容体アゴニスト）および Dynorphin A（10 nmol，κ 受容体アゴニスト）は体温低下を誘導しなかった（図 3-A）．さらに，視床下部の各部位に μ 受容体アゴニスト（［D-Ala^2, N-MePhe^4, Gly-ol］-enkephalin：DAMGO）を微量投与したところ，前視床下部（AH）や背内側部（DMH）など視床下部の広域で μ 受容体を介した体温低下が認められた（図 3-B）．この結果から，ハムスターでは視床下部広域に存在する μ 受容体を活性化することで低体温が誘導されることが明らかとなった．

次に，冬眠維持期の低体温におけるオピオイドの関与を明らかにするために，冬眠ハムスターにオピオイド受

容体アンタゴニストを投与しその影響を検討した（Tamura et al., 2005）．冬眠導入期（冬眠開始 17 時間後）に非選択的オピオイド受容体アンタゴニストの naloxone（10 nmol）を側脳室から投与したところ，ハムスターの体温変化は認められなかった．一方，冬眠維持期（冬眠開始 30 時間後）のハムスターに naloxone を投与すると体温が上昇し覚醒が誘導された（図 3-C）．興味深いことに，冬眠開始 27 時間後までは naloxone による体温上昇は認められないが，28 時間を越えると覚醒が誘導される個体が出現するようになり，30 時間後ではすべての冬眠個体において覚醒が誘導された．冬眠ハムスターの体温に対する CPT の作用と naloxone の作用は非常によく相反していることから，冬眠導入期はアデノシン系によって低体温が誘導され，冬眠開始 30 時間前後で体温制御機構がアデノシン系からオピオイド系に切替わり，オピオイド系によって低体温が維持されていることが示唆された．またこれらの結果は，体温 6℃という低温下で一定の神経活動が持続的に機能していることを示唆する．さらに，選択的オピオイド受容体アンタゴニストを用い，そのサブタイプを同定した．選択的 μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine（10 nmol）は体温上昇を誘導し冬眠を中断させたが，選択的 δ 受容体アンタゴニストの naltrindole や選択的 κ 受容体アンタゴニストの nor-Binaltorphimine（nor-NBI）は冬眠中の体温に影響しなかった（図 3-D）．以上より，冬眠維持期の低体温は，μ_1 受容体を介したオピオイド系によって維持されていることが明らかとなった．

さらに冬眠維持期におけるオピオイド系による低体温制御機構の詳細を解析した（Tamura et al., 2012）．転写因子 c-Fos は，神経活動により速やかに誘導される最初期遺伝子（immediate-early genes）の一つとして，神経活動の指標として汎用されている．そこで，冬眠開始に伴う視床下部における神経活動の変化を，抗 c-Fos 抗体を用い免疫組織学的に解析した．冬眠開始 1 時間後には，前視床下部（AH）・腹内側部（ventromedial hypothalamus：VMH）・背内側部（DMH）での神経活動は有意に減弱していたが，弓状核（arcuate nucleus：ARC）でのみ神経活動の有意な亢進が認められた（図 3-E）．弓状核には β-endorphin 陽性細胞が局在する（Lantos et al., 1995）．そこで，冬眠開始後の弓状核における内因性オピオイド β-endorphin の発現変化を免疫組織学的に解析したところ，冬眠開始 1 時後には細胞体における β-endorphin 陽性シグナルの増強が認められた．さらに冬眠開始 17 時間後には軸索から神経終末へ β-endorphin 陽性シグナルが移行すること，また，冬眠開始 30 時間後でも冬眠開始前と同レベルの β-endorphin 陽性シグナルが観察された（図 3-F）．β-endorphin は，プロセッシング酵素の prohormone convertase 2（PC2, Zhou et al., 1993）や PC2 の活性を制御する secretogranin V（7B2, Braks and Martens, 1994）などの作用によってプロピオメラノコルチンから合成される．PC2 および 7B2 の発現は，冬眠開始 17 時間，30 時間後いずれにおいても前冬眠期に比べ有意に増加しており，冬眠開始後に β-endorphin が合成されていることが示唆された．一方，視索前野や前視床下部における内因性オピオイドの endomorphin の発現変化を免疫組織染色にて解析したところ，c-Fos 同様，冬眠開始直後に顕著に減少していた．これらの結果から，冬眠開始後に弓状核で合成された β-endorphin が，熱産生系の抑制および/もしくは熱産生抑制系の脱抑制を介し，冬眠維持期の低体温を制御していることが示唆された．

μ 受容体アゴニストは，低温誘導神経細胞死や 6-hydroxydopamine 誘導神経細胞死に対して保護作用を有する（Tamura et al., 2006; Eftekhar-Vaghefi et al., 2015）．また，δ 受容体アゴニストには，様々な臓器における虚血再灌流障害に対する保護作用が多く報告されている（Yamanouchi et al., 2003; Borlongan et al., 2009; Wang et al., 2015; Wang et al., 2016; Seewald et al., 2016）．β-endorphin には μ 受容体だけでなく δ 受容体との親和性も報告されている（Raynor et al., 1994）．これらを考慮すると，冬眠開始後に合成される内因性 β-endorphin は，μ 受容体を介して低体温を制御するだけでなく，μ 受容体や δ 受容体を介して低体温による神経障害や覚醒時の再灌流障害に対して保護的な役割を担っていることが示唆される．

3. 覚醒期の体温制御機構

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（thyrotropin releasing hormone：TRH）は，甲状腺ホルモン（T_3, T_4）の作用を介して熱産生を亢進させるだけでなく，それ自身が中枢性の内因性生理活性物質として熱産生を制御することが示唆されていた（Hori et al., 1988）．また，ジリスの視床下部における TRH 受容体数が，非冬眠期と冬眠期さらには低体温時で異なることが報告されており（Stanton et al., 1992），冬眠時の体温制御においても TRH の関与が推測された．

そこで，冬眠ハムスターの体温制御における TRH の関与を明らかにするために，TRH および抗 TRH 抗体を用いその影響を検討した（Tamura et al., 2005）．TRH

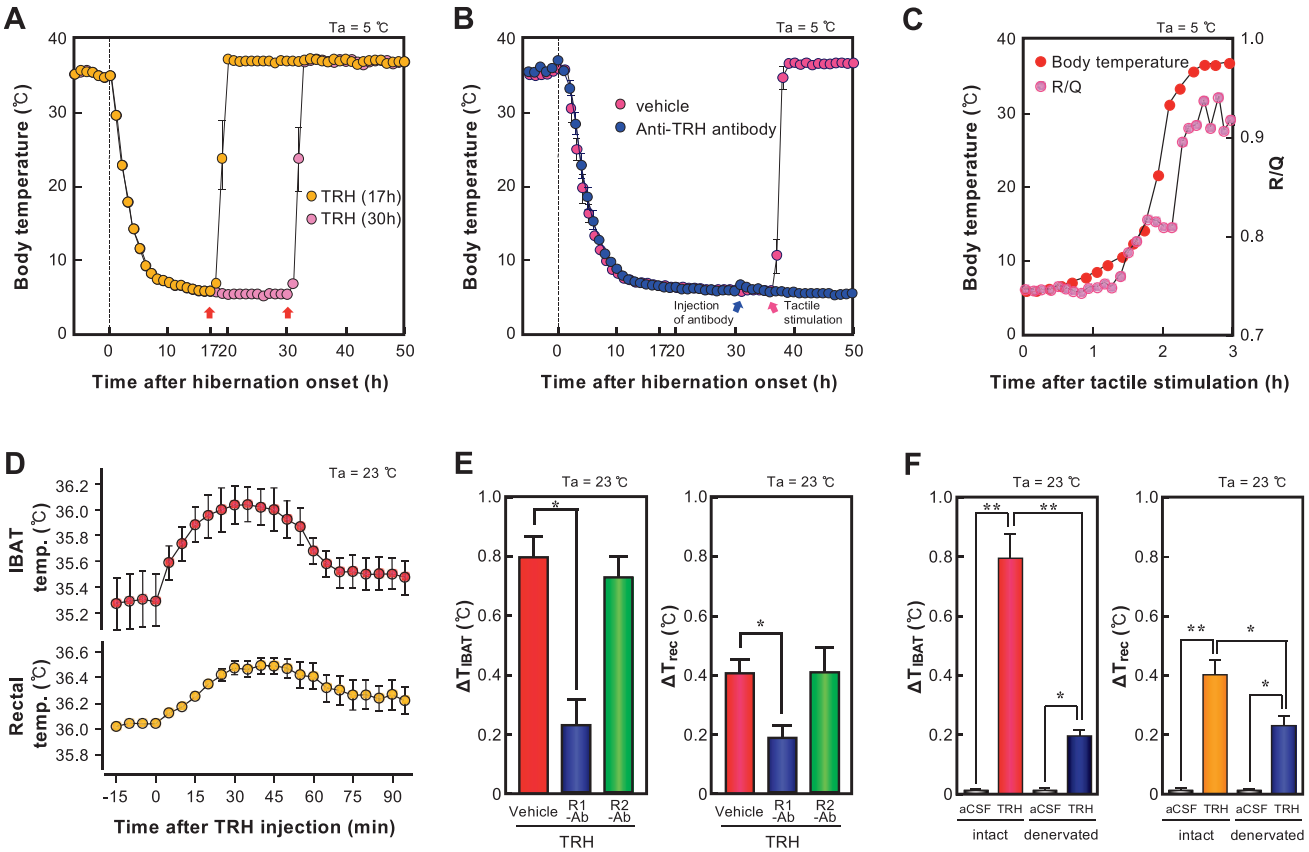


図 4：覚醒時の体温制御における TRH の作用（Tamura ら（2005），Shintani ら（2005b）より引用/一部改変）
（A）冬眠時の体温に対する TRH の影響．冬眠開始 17 時間後（●）もしくは 30 時間後（●）に，TRH（55.2 pmol）を側脳室から投与し，深部体温に対する影響を検討した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（B）触刺激誘導覚醒に対する抗 TRH 抗体の影響．**冬眠開始 30 時間後に，PBS（vehicle ●）もしくは抗 TRH 抗体（●）を側脳室から投与し，投与 5 時間後に触刺激にて覚醒を誘導した．各深部体温データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（C）触刺激誘導覚醒時における体温と呼吸商（respiratory quotient：R/Q）の関係．**冬眠ハムスターに触刺激を加えた後，体温（●）および酸素消費量，二酸化炭素排出量を連続測定した．R/Q（●）は，二酸化炭素排出量/酸素消費量から算出した．**（D）非冬眠ハムスターの体温に対する TRH の影響．**イソフルラン麻酔下にて TRH（552 pmol）を側脳室から投与し，肩甲骨間褐色脂肪組織温（IBAT temp. ●）および直腸温（rectal temp. ●）を測定した．各データは平均±SEM で示した（n＝6）．**（E）TRH 誘導体温上昇に対する抗 TRH 受容体抗体の影響．**イソフルラン麻酔下にて TRH（552 pmol）を側脳室から投与し，体温上昇を誘導した．抗 TRH 受容体タイプ 1 抗体（R1-Ab）および抗 TRH 受容体タイプ 2 抗体（R2-Ab）は TRH 投与前に側脳室より投与した．IBAT 温および直腸温の変化（ΔT_{IBAT}，ΔT_{rec}）は平均±SEM で示した（n＝6）．$^*P<0.05$ **（F）TRH 誘導体温上昇に対する交感神経切除の影響．**IBAT に投射する交感神経を切除したのち，TRH（552 pmol）を側脳室から投与した．IBAT 温および直腸温の変化（ΔT_{IBAT}，ΔT_{rec}）は平均±SEM で示した（n＝6）．$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$

（55.2 pmol）を冬眠開始 17 時間後および 30 時間後にそれぞれ側脳室から投与したところ，いずれも体温が上昇し覚醒が誘導された（図 4-A）．また，触刺激による覚醒誘導は，抗 TRH 抗体の前投与によって阻害された（図 4-B）．さらに触刺激誘導覚醒時における体温上昇と呼吸商の関係を解析したところ，復温初期の体温が 10℃に達するまでは脂質代謝が中心に行われることが明らかとなった（図 4-C）．覚醒初期はふるえも認められないことから，覚醒期の体温上昇は TRH 刺激による褐色脂肪組織（brown adipose tissue：BAT）の非ふるえ熱産生を介して誘導されていることが示唆された．

そこで TRH による熱産生制御機構の詳細を非冬眠ハムスターを用いて検討した（Shintani et al., 2005b）．TRH を麻酔下にて側脳室から投与したところ，BAT 温，直腸温ともに一過性の温度上昇が認められた（図 4-D）．次に，体温上昇を惹起する TRH 受容体サブタイプを同定した．抗 TRH-R1 抗体は，TRH による BAT 温および直腸温の上昇を有意に抑制したが，抗 TRH-R2 抗体は影響しなかった（図 4-E）．また，視床下部の各部位に TRH を微量投与したところ，視索前野，前視床下部，腹内側部，背内側部で BAT 温および直腸温の有意な上昇が認められた．さらに，BAT に投射する交感神経を切除しその影響を検討したところ，TRH による BAT 温および直腸温の上昇はいずれも有意に抑制された（図 4-F）．その後，冬眠維持期のハムスターにアドレナリン β_3 受容体アンタゴニストを大腿静脈より投与すると，

BAT による非ふるえ熱産生が抑制され触刺激誘導体温上昇が抑制されることが報告された（Kitao and Hashimoto, 2012）．一方，側脳室内に投与した TRH が内分泌系を賦活化させるかを確認したところ，血清中の甲状腺ホルモン（T_3, T_4）の有意な変化は認められなかった．これらを考慮すると，TRH は視床下部の R1 受容体刺激を介して交感神経を賦活化し，β_3 受容体を介して BAT における非ふるえ熱産生を亢進することで，覚醒初期の体温上昇を惹起していることが示唆された．少なくともジリスの冬眠期における中途覚醒初期の体温上昇は，BAT の非ふるえ熱産生によって惹起されることが報告されている（Ballinger and Andrews, 2018）．

4. 冬眠ハムスターの体温を制御するその他の機構

オレキシンは覚醒や摂食行動の制御（Sakurai et al., 1998; Sakurai 2007）だけでなく，BAT の非ふるえ熱産生の制御にも関与している（Sellayah et al., 2011; Tupone et al., 2011; Madden et al., 2012）．また TRH がオレキシン神経系の活動を制御する（Gonzále et al., 2009; Hara et al., 2009）ことから，冬眠ハムスターの覚醒期の TRH-R1 受容体を介した体温上昇におけるオレキシンの関与が示唆された．そこで，TRH 誘導体温上昇における内因性オレキシンの関与を明らかにするために，オレキシン受容体アンタゴニストを用いその影響を検討した（データ未掲載）．オレキシン受容体には，OX_1 および OX_2 の 2 つのサブタイプが存在する．そこで，OX_1 受容体アンタゴニスト（SB-334867，100 pmol）および OX_2 受容体アンタゴニスト（TCS OX_2 29，100 pmol）を非冬眠ハムスターに前投与し，TRH（552 pmol）を側脳室から投与したところ，TRH による一過性の体温上昇はいずれも認められなかった．これらの結果から，非冬眠ハムスターの TRH 誘導体温上昇には内因性のオレキシンがその下流で関与していることが示唆された．次に，冬眠ハムスターの覚醒時の体温上昇における内因性オレキシンの関与を明らかにするために，OX_1 受容体および OX_2 受容体の両者のリガンドとなるオレキシン A の抗血清を用いその影響を検討した．冬眠維持期に抗オレキシン抗体を側脳室から投与し，投与 5 時間後に TRH にて覚醒を誘導したところ，体温は上昇せず覚醒も認められなかった（データ未掲載）．非冬眠動物における低体温誘導時のオレキシン神経系を介した体温制御（Tupone et al., 2011; Futatsuki et al., 2018）に加え，最近，ハムスターの冬眠時のオレキシン神経系の機能変化が報告されている（López et al., 2022）．我々の結果と兼ね合わせると，冬眠の覚醒期の体温制御には，TRH-オレキシン系がその中心的な役割を担っていることが示唆される．

ボンベシン様ペプチドとして知られているガストリン放出ペプチド（gastrin-releasing peptide：GRP）やニューロメジン B（neuromedin B：NMB）は，脳室内投与により非冬眠動物のラットの低体温を誘導することが報告されている（Tsushima et al., 2003）．また，GRP 受容体欠損マウスや NMB 受容体欠損マウスでは，ボンベシン様ペプチド誘導低体温が抑制されることも報告されている（Wada et al., 1997; Ohki-Hamazaki et al., 1999）．そこで，冬眠ハムスターの体温制御におけるボンベシン様ペプチドの関与を明らかにするために，GRP を非冬眠ハムスターの側脳室に投与し体温への影響を検討した（データ未掲載）．GRP（10–1000 pmol，icv）はハムスターの体温に影響しなかった．ところが，GRP は CHA（A_1 受容体アゴニスト）誘導低体温を抑制し，その抑制効果はボンベシン受容体アンタゴニスト（PD176252，100 pmol）の前投与にて有意に減弱した．一方，GRP は DAMGO（μ 受容体アゴニスト）誘導低体温には影響しなかった．これらの結果から，GRP はアデノシン系を介した冬眠導入期の体温低下を抑制的に制御していることが示唆された．また，冬眠ハムスターの視床下部における *Grp* 発現量は，前冬眠期に比べると有意に低下していた．冬眠期のジリスの視床下部内ではボンベシン様ペプチドが減少する（Muchlinski et al., 1983）ことも報告されており，低体温期におけるボンベシン様ペプチドの減少が冬眠開始の引き金になっていることが示唆された．GRP は光刺激に依存して分泌され体内時計を制御することが知られているが，ラットやマウスとハムスターではその分泌反応性が異なることが報告されており（Shinohara et al., 1993; Karatsoreos et al., 2006; Francl et al., 2010），GRP の機能的な種差が推測される．

本稿で紹介したように，これまでにハムスターの冬眠導入期，維持期，そして覚醒期の体温制御の一端が明らかとなった．しかし，他の体温制御物質（Popova et al., 1993; Sallmen et al., 2003a, 2003b; Voronova, 2021）の関与，あるいは，それぞれの体温制御の調節機構や冬眠発動機構など，未だ不明な点も多くそれらの解明には今後のさらなる検討が必要である．

参考文献

Anderson, R., Sheehan, M. J., Strong, P. (1994).

Characterization of the adenosine receptors mediating hypothermia in the conscious mouse. Br J Pharmacol. **113** (4), 1386–90. doi: 10.1111/j.1476–5381.1994.tb17151.x.

Baker, A. K., Meert, T. F. (2002). Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of mu, delta, and kappa opioid receptor subtypes on body temperature in mice. J Pharmacol Exp Ther, **302**(3), 1253–1264. doi: 10.1124/jpet.102.037655.

Ballinger M. A., Andrews M. T. (2018) Nature's fat-burning machine: brown adipose tissue in a hibernating mammal. J Exp Biol, **221** (Pt Suppl 1), jeb162586. doi: 10.1242/jeb.162586.

Beckman, A. L., Llados-Eckman, C. (1985). Antagonism of brain opioid peptide action reduces hibernation bout duration. Brain Res, **328** (2), 201–205. doi: 10.1016/0006–8993(85)91030–3.

Borlongan C.V., Hayashi T., Oeltgen P.R., Su T.P., Wang Y. (2009) Hibernation-like state induced by an opioid peptide protects against experimental stroke. BMC Biol, **7**, 31. doi: 10.1186/1741–7007–7–31

Braks J. A., Martens G. J. (1994) 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. Cell, **78**(2), 263–273. doi: 10.1016/0092–8674(94)90296–8.

Dunwiddie T.V., Masino S.A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu Rev Neurosci, **24**, 31–55. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.31.

Eftekhar-Vaghefi S., Esmaeili-Mahani S., Elyasi L., Abbasnejad M. (2015) Involvement of Mu opioid receptor signaling in the protective effect of opioid against 6-hydroxydopamine-induced SH-SY5Y human neuroblastoma cells apoptosis. Basic Clin Neurosci, **6**(3), 171–178.

Fastbom, J., Pazos, A., Palacios, J.M. (1987). The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. Neuroscience, **22**(3), 813–826. doi: 10.1016/0306–4522(87)92961–7.

Fields R. D., Burnstock G. (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. Nat Rev Neurosci, **7** (6), 423–36. doi: 10.1038/nrn1928.

Francl J. M., Kaur G., Glass J. D. (2010) Roles of light and serotonin in the regulation of gastrin-releasing peptide and arginine vasopressin output in the hamster SCN circadian clock. Eur J Neurosci, **32**(7), 1170–1179. doi: 10.1111/j.1460–9568.2010.07374.x.

Freissmuth, M., Klotz, K. N. (2017) Chapter 1 - Adenosine Receptor Biology in the Central Nervous System. Adenosine Receptors in Neurodegenerative Diseases, Edited by Blum D., Lopes L.V., 3–22. Academic Press. doi: 10.1016/B978–0–12–803724–9.00001–6.

Futatsuki T., Yamashita A., Ikbar K.N., Yamanaka A., Arita K., Kakihana Y., Kuwaki T. (2018) Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. Sci Rep **8**(1), 2717. doi: 10.1038/s41598–018–21252–w.

González J.A., Horjales-Araujo E., Fugger L., Broberger C., Burdakov D. (2009) Stimulation of orexin/hypocretin neurones by thyrotropin-releasing hormone. J Physiol, **587** (Pt 6), 1179–1186. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167940.

Hori T., Yamasaki M., Asami T., Koga H., Kiyohara T. (1988) Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to thyrotropin releasing hormone and cyclo (His-Pro). Neuropharmacology, **27** (9), 895–890. doi: 10.1016/0028–3908(88)90116–5.

Jinka T.R., Tøien Ø., Drew K.L. (2011) Season primes the brain in an arctic hibernator to facilitate entrance into torpor mediated by adenosine A_1 receptors. J Neurosci, **31** (30), 10752–10758. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1240–11.2011.

Karatsoreos I.N., Romeo R.D., McEwen B.S., Silver R. (2006) Diurnal regulation of the gastrin-releasing peptide receptor in the mouse circadian clock. Eur J Neurosci, **23**(4), 1047–1053. doi: 10.1111/j.1460–9568.2006.04633.x.

Lantos T. A., Gorcs T. J., Palkovits M. (1995) Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premamillary region of the hypothalamus in rats. Brain Res Brain Res Rev, **20**(2), 209–249. doi: 10.1016/0165–0173(94)00013-f.

Lee T. F., Nurnberger F., Wang L. C. H. (1993) Possible involvement of endogenous adenosine in hibernation. Life in the Cold: Ecological, Physiological, and Molecular Mechanisms, Edited by Carey C., Florant G.L., Wunder B.A. Horwitz B., pp 315–322, Westview Press.

Liu, Z. W., Gao, X. B. (2007) Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. J Neurophysiol, **97**(1), 837–48. doi: 10.1152/jn.00873.2006.

López J.M., Carballeira P., Pozo J., León-Espinosa G., Muñoz A. (2022) Hypothalamic orexinergic neuron changes during the hibernation of the Syrian hamster. Front Neuroanat, **16**, 993421. doi: 10.3389/fnana.2022.993421.

Matuszek, M., Gagalo, I. T. (1996) The effect of N^6-cyclohexyladenosine and 5'-*N*-ethylcarboxamidoadenosine on body temperature in normothermic rabbits. Gen Pharmacol. **27** (3), 467–469. doi: 10.1016/0306–3623 (95)00098–4.

Muchlinski A.E., Ho F.J., Chew P., Yamada T. (1983) The concentrations of four neuropeptides in various brain areas of summer active and hibernating Spermophilus lateralis, Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol, **74**(1), 185–189. doi: 10.1016/0742–8413(83)90172-x.

Nakamura, K. (2011) Central circuitries for body temperature regulation and fever. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, **301** (5), R1207–1228. doi: 10.1152/ajpregu.00109.2011.

Oeltgen P.R., Nilekani S.P., Nuchols P.A., Spurrier W.A., Su T. P. (1988) Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in

summer-active ground squirrels. Life Sci, **43**(19), 1565–1574. doi: 10.1016/0024-3205(88)90406-7.

Ohki-Hamazaki H., Sakai Y., Kamata K., Ogura H., Okuyama S., Watase K., Yamada K., Wada K. (1999) Functional properties of two bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. J Neurosci, **19**(3), 948–954. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-03-00948.1999.

Popova N.K., Voronova I.P., Kulikov A.V. (1993) Involvement of brain tryptophan hydroxylase in the mechanism of hibernation. Pharmacol Biochem Behav, **46**(1), 9–13. doi: 10.1016/0091-3057(93)90309-h.

Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I., Reisine T. (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. Mol Pharmacol, **45**(2), 330–334.

Sallmen T., Lozada A.F., Anichtchik O.V., Beckman A.L., Panula P. (2003a) Increased brain histamine H_3 receptor expression during hibernation in golden-mantled ground squirrels. BMC Neurosci. **4**, 24. doi: 10.1186/1471-2202-4-24.

Sallmen T., Lozada A.F., Beckman A.L., Panula P. (2003b) Intrahippocampal histamine delays arousal from hibernation. Brain Res. **966**(2), 317–320. doi: 10.1016/s0006-8993(02)04235-x.

Seewald M., Coles Jr. J.A., Sigg D.C., Iaizzo P.A. (2017) Featured article: pharmacological postconditioning with delta opioid attenuates myocardial reperfusion injury in isolated porcine hearts. Exp Biol Med (Maywood), **242**(9), 986–995. doi: 10.1177/1535370216684041

Shinohara K., Tominaga K., Isobe Y., Inouye S.T. (1993) Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. J Neurosci, **13**(2), 793–800. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-02-00793.1993.

Haas, H.L., Selbach, O. (2000) Functions of neuronal adenosine receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **362**(4–5), 375–381. doi: 10.1007/s002100000314.

Hara J., Gerashchenko D., Wisor J.P., Sakurai T., Xie X., Kilduff T.S. (2009) Thyrotropin-releasing hormone increases behavioral arousal through modulation of hypocretin/orexin neurons. J Neurosci, **29**(12), 3705–3714. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0431-09.2009.

Handler C.M., Piliero T.C., Geller E.B., Adler M.W. (1994) Effect of ambient temperature on the ability of mu-, kappa- and delta-selective opioid agonists to modulate thermoregulatory mechanisms in the rat. J Pharmacol Exp Ther, **268**(2), 847–855.

Kitao N., Hashimoto M. (2011) Increased thermogenic capacity of brown adipose tissue under low temperature and its contribution to arousal from hibernation in Syrian hamsters. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, **302**(1), R118–125. doi: 10.1152/ajpregu.00053.2011.

Madden C.J., Tupone D., Morrison S.F. (2012) Orexin modulates brown adipose tissue thermogenesis. Biomol Concepts, **3**(4), 381–386. doi: 10.1515/bmc-2011-0066.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S, Arch J.R., Buckingham R.E, Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S, Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. (1998). Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell **92**(4), 573–585. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6.

Sakurai T. (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. Nat Rev Neurosci, **8**(3), 171–81. doi: 10.1038/nrn2092.

Sallmen T., Lozada A.F., Beckman A.L., Panula P. (2003) Intrahippocampal histamine delays arousal from hibernation. Brain Res, **966**(2), 317–320. doi: 10.1016/s0006-8993(02)04235-x.

Sellayah D, Bharaj P, Sikder D. (2011) Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. Cell Metab, **14**(4), 478–490. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.010.

Shintani M., Tamura Y., Monden M., Shiomi H. (2005a) Characterization of N(6)-cyclohexyladenosine-induced hypothermia in Syrian hamsters. J Pharmacol Sci, **97**(3), 451–454. doi: 10.1254/jphs.sc0040178.

Shintani M., Tamura Y., Monden M., Shiomi H. (2005b) Thyrotropin-releasing hormone induced thermogenesis in Syrian hamsters: site of action and receptor subtype, Brain Res, **1039**(1–2), 22–29. doi: 10.1016/j.brainres.

Stanton T.L., Caine S.B., Winokur A. (1992) Seasonal and state-dependent changes in brain TRH receptors in hibernating ground squirrels, Brain Res Bull, **28**(6), 877–886. doi: 10.1016/0361-9230(92)90208-f.

Szymusiak, R. (2018) Chapter 20 - Body temperature and sleep. Handbook of Clinical Neurology, **156**, 341–351. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00020-5.

Tamura Y., Shintani M., Nakamura A., Monden M., Shiomi H. (2005) Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. Brain Res. **1045**(1–2), 88–96. doi: 10.1016/j.brainres.

Tamura T., Monden M., Shintani M., Kawai A., Shiomi H. (2006) Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. Brain Res, **108**(1), 107–116. doi: 10.1016/j.brainres.2006.06.020.

Tamura Y, Shintani M, Inoue H, Monden M, Shiomi H (2012) Regulatory mechanism of body temperature in the central nervous system during the maintenance phase of hibernation in Syrian hamsters: involvement of β-endorphin. Brain Res, **1448**, 63–70. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.004.

Thakkar, M.M., Engemann, S.C., Walsh, K.M., Sahota, P.K. (2008) Adenosine and the homeostatic control of sleep: effects of A1 receptor blockade in the perifornical lateral hypothalamus on sleep-wakefulness. Neuroscience, **153**(4): 875–80. doi: 10. 1016/j.neuroscience.2008.01.017.

Ticho S.R., Radulovacki M. (1991) Role of adenosine in sleep and temperature regulation in the preoptic area of rats. Pharmacol Biochem Behav, **40** (1), 33–40. doi: 10.1016/0091–3057(91)90317-u.

Tupone D., Madden C.J., Cano G., Morrison S.F. (2011) An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. J Neurosci, **31** (44), 15944–15955. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3909–11.2011.

Tsushima H., Mori M., Fujiwara N., Moriyama A. (2003) Pharmacological characteristics of bombesin receptor mediating hypothermia in the central nervous system of rats. Brain Res, **969** (1–2), 88–94. doi: 10.1016/s0006–8993(03)02281–9.

Voronova I. P. (2021) 5-HT Receptors and Temperature Homeostasis. Biomolecules, **11** (12), 1914. doi: 10.3390/biom11121914.

Wada E., Watase K., Yamada K., Ogura H., Yamano M., Inomata Y., Eguchi J., Yamamoto K., Sunday M.E., Maeno H., Mikoshiba K., Ohki-Hamazaki H., Wada K. (1997) Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor. Biochem Biophys Res Commun, **239**(1), 28–33. doi: 10.1006/bbrc.1997.7418.

Wang Z., Tang B., TangF., Li Y., Zhang G., Zhong L., Dong C., He S. (2015) Protection of rat intestinal epithelial cells from ischem ia/reperfusion injury by (D-Ala2, D-Leu5) -enkephalin through inhibition of the MKK7-JNK signaling pathway. Mol Med Rep, **12** (3), 4079–4088. doi: 10.3892/mmr.2015.3991.

Wang S.Y., Duan Y.L., Zhao B., Wang X.R., Zhao Z., Zhang G. M. (2016) Effect of delta opioid receptor activation on spatial cognition and neurogenesis in cerebral ischemic rats. Neurosci Lett, **620**, 20–26. doi: 10.1016/j.neulet.2016.03.035.

Yamanouchi K., Yanaga K., Okudaira S., Eguchi S., Furui J., Kanematsu T. (2003) [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat. J Surg Res, **114**, 72–77. doi: 10.1016/S0022–4804(03)00196–3

Zhou A., Bloomquist B.T., Mains R.E. (1993) The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. J Biol Chem, **268**(3), 1763–1769. doi: 10.1016/S0021–9258(18)53918–1.

低温科学 81 （2023） 159–172
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 159

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？

曽根　正光[1)]，山口　良文[1)]

2023 年 1 月 23 日受付，2023 年 1 月 24 日受理

小型の冬眠哺乳類は冬眠時に体温が非常に低くなるが，それによってダメージを受けることがない．それは，少なくとも部分的には，冬眠哺乳類由来の培養細胞は低温下で長く生存するというような，冬眠哺乳類が生得的にもつ細胞レベルの低温耐性能力によって説明される．近年ヒト細胞株を用いた研究から低温における細胞死は過酸化脂質の蓄積によって引き起こされるフェロトーシスと呼ばれるタイプの細胞死に類似することが明らかになってきた．本稿では，冬眠哺乳類の細胞がどのようにして低温誘導性のフェロトーシスを回避しているか，最近のがん研究の成果も交えて考察するとともに，高次の臓器・全身レベルの低温耐性機構についても触れる．

How do cells of mammalian hibernators cope with cold stress?

Masamitsu Sone[1] and Yoshifumi Yamaguchi[1]

The body temperatures of small mammalian hibernators drop to very low levels during hibernation, but the animals are not damaged by it. This can be explained, at least in part, by a cellular tolerance to low temperatures, such as the ability of cultured cells from hibernators to survive longer at low temperatures than those from non-hibernators. Recent studies using human cell lines have shown that cell death at low temperatures resembles a type of cell death called ferroptosis, which is caused by the accumulation of lipid peroxide. In this article, we discuss how mammalian hibernators avoid low-temperature-induced ferroptosis at cellular level, including recent results from cancer research, and also discuss the mechanisms of low-temperature tolerance at organ and systemic levels.

キーワード：冬眠，低温耐性，フェロトーシス，活性酸素種，ビタミン E
hibernation, low-temperature tolerance, ferroptosis, ROS, vitamin E

1．はじめに

哺乳類の冬眠は，著しい低代謝状態をとることでエネルギーを節約し，冬季を生存するための適応戦略である．小型の冬眠哺乳類は冬眠期において，熱産生を減弱して低体温となり不動状態が数日間続く深冬眠と，そこから急速に体温を回復して通常体温で活動をする 1 日以下の中途覚醒を幾度も繰り返す．深冬眠時の体温は外気温より 1℃程度高い状態に保たれ，巣穴の中が氷点下になりうるホッキョクジリス（arctic ground squirrel，AGS）においてはときに 0℃を下回る体温となるとされる（Barnes, 1989）．もしもヒトのような非冬眠哺乳類がこのように劇的な体温低下を経験すれば，脳や心臓，呼吸器が機能を停止し，あらゆる臓器で細胞死が引き起こされて死に至るであろう．従って，冬眠哺乳類には，低体温によって生じるストレスに対処するための特別な分子

連絡先
曽根　正光
北海道大学低温科学研究所冬眠代謝生理発達分野
〒060–0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011–706–7439
e-mail：msone@lowtem.hokudai.ac.jp

1）北海道大学低温科学研究所冬眠代謝生理発達分野
〒060–0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Hibernation Metabolism, Physiology and Development Group, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University・Kita-19, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo, 060–0819, Japan

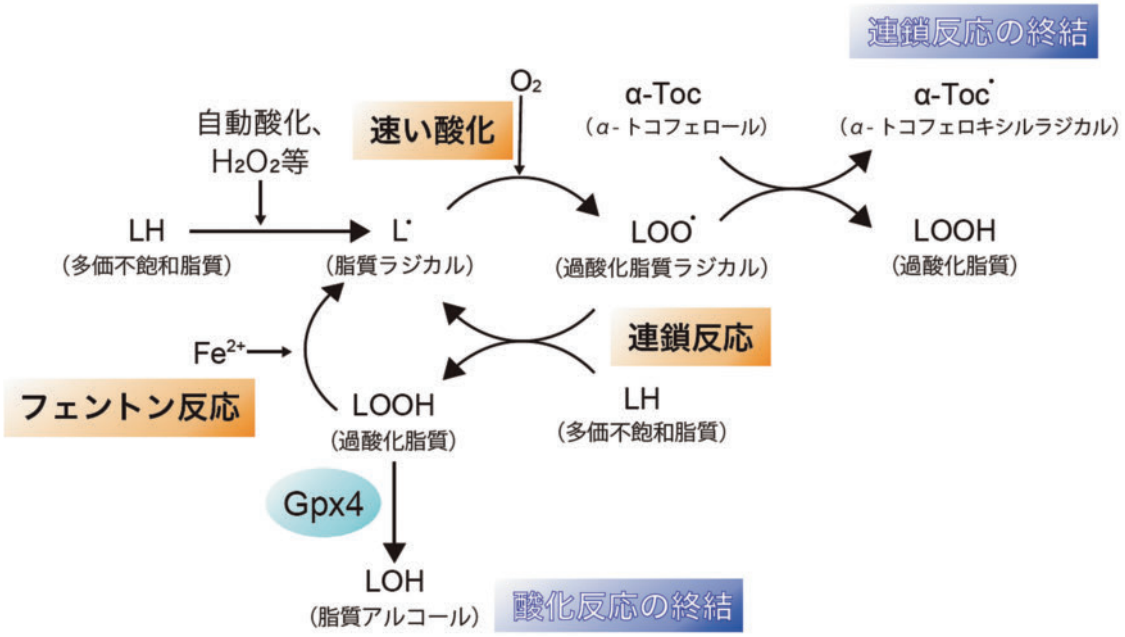


図1：フェロトーシスにおける脂質の酸化反応．Gpx4 とビタミン E 同属体の一つ α トコフェロールによるフェロトーシス抑制作用についても示す．

メカニズムが備わっていると考えられる．本稿では，主に細胞レベルの，冬眠哺乳類が持つ生得的な低温耐性機構について論じ，臓器レベル，全身レベルでの低温耐性機構についても触れる．

2．低温における哺乳類細胞の細胞死（≒フェロトーシス）

非冬眠哺乳類と冬眠哺乳類の培養細胞を 10℃ 以下の低温環境下に置いて比較すると，前者は多くの場合，2，3 日のうちに死滅するのに対し，後者は 5 日以上生存するという，明らかな低温耐性能力の違いが観察される（Anegawa et al., 2021; Hendriks et al., 2020; Hendriks et al., 2017; Ou et al., 2018）．個体及び臓器から切り離された培養皿上の細胞が低温に耐性を持つことから，こうした能力は細胞自律的と言える．冬眠哺乳類の細胞がどのような分子基盤に基づいて低温耐性能力を発揮するのかを議論する上で，まず，低温での細胞死がいかにして生じるかを述べる．

服部らは，活性酸素種（ROS）によって活性化される Appoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）-p38 MAPK 経路が低温刺激によっても活性化すること，さらに ASK1 または p38 を機能阻害すると低温によって引き起こされる細胞死が抑制されることを，複数のヒト細胞株において見出した（Hattori et al., 2017）．次いで彼らは，この低温誘導性の細胞死がどういった種類の細胞死であるか，各種細胞死の阻害剤を用いて検証した．その結果，ヒトがん細胞の低温誘導性細胞死は，アポトーシスやネクロトーシスの阻害剤では抑制できない一方でフェロトーシス阻害剤によって完全に抑制されたことから，フェロトーシスに極めて近い性質を持つことが明らかとなった（Hattori et al., 2017）．

フェロトーシス（ferroptosis）とは，Ras がん原遺伝子に活性化型の突然変異を持つヒトがん細胞を特異的に細胞死させる薬剤エラスチンの薬理研究から比較的最近提唱された細胞死様式である（Dixon et al., 2012）．フェロトーシスでは，鉄イオンに依存した過酸化脂質及び脂質ラジカル体の蓄積によって，最終的に細胞形質膜が崩壊し，ネクローシスに似た細胞形態を呈する（Dixon et al., 2012）．特に，細胞内の多価不飽和脂肪酸は，脂質ラジカルの産生源となる．二重結合を有する炭素原子に挟まれる炭素原子（R1－C＝C－C－C＝C－R2 の下線部）に結合する水素原子が遊離して生成された脂質ラジカルは，分子酸素により速やかに酸化され過酸化脂質ラジカルとなる（図 1）（Conrad & Pratt, 2019）．こうした反応は自然酸化や ROS（過酸化水素（H_2O_2）など）の作用により細胞内で常時生じうる．次に過酸化脂質ラジカルは周囲の不飽和脂肪酸から水素を引き抜き，脂質ラジカルと過酸化脂質を生じる．過酸化脂質は比較的安定な物質ではあるが，除去されず蓄積した場合，フェントン反応と呼

ばれる鉄イオンを介した反応などにより新たな脂質ラジカルが発生する．よって，1サイクルあたり脂質ラジカルが1個から2個に増加する反応となり，脂質ラジカル体が指数関数的に増加する．こうした脂質酸化の連鎖反応が細胞形質膜やオルガネラ膜を伝播して膜の崩壊へとつながると考えられている．細胞内でこのような反応を防ぐ主要な役割を果たす酵素がグルタチオンペルオキシダーゼ4（Gpx4）である．Gpx4はグルタチオン依存的に過酸化脂質を還元し脂質アルコールへと変換することで，脂質酸化の連鎖反応を回避している．これまでに開発されたフェロトーシス誘導性薬剤の大部分は直接的あるいは間接的にGpx4の機能を阻害することでフェロトーシスを誘導する（Yang et al., 2014）．

低温誘導性細胞死が脂質の酸化によって引き起こされるのだとすれば，それを回避する手段は3通り考えられる．脂質の酸化そのものが生じないようにすること，酸化脂質を速やかに除去すること，酸化脂質の拡大を防ぐことである．以降では，冬眠哺乳類の研究知見を中心に，非冬眠哺乳類での知見も交えつつ，この点について議論する．

3．冬眠哺乳類細胞における脂質酸化抑制機構

3.1　ミトコンドリア

通常ミトコンドリアは体内で消費される酸素の90%以上を消費するROSの最大の発生源である．低温において脂質酸化を引き起こすROSの発生源が何であるか不明であるが，ミトコンドリアは有力な候補の一つであり，冬眠哺乳類の細胞は低温においてミトコンドリアからのROSの発生を防ぐ何らかの機構を有する可能性が高い．この点に関する報告例をいくつか紹介する．

まず，ヒトとシリアンハムスター（以下ハムスター）の腎臓に由来する細胞株を比較すると，低温環境下でヒト細胞のミトコンドリアの膜電位が低下するのに対し，ハムスター細胞ではそうした変化が見られないとの報告がある（Hendriks et al., 2017）．また同論文において，ヒト細胞のミトコンドリアは通常温度では網目状の構造を取っており，低温でそれが断片化する様子が観察されるが，ハムスター細胞のミトコンドリアはそもそも断片化したミトコンドリアを有し，低温ストレスによって形態が変化しないと報告された．一方，ヒトおよびジュウサンセンジリス（thirteen-lined ground squirrel，TGS）由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化させた神経細胞を4℃の低温ストレスに曝すと，（前述の腎臓細胞株とは逆に）ヒト神経細胞のミトコンドリアは膜電位が上昇し過分極となるが，TGS神経細胞ではそうした変化が起こらない（Ou et al., 2018）．これらの知見は冬眠哺乳類のミトコンドリアが温度低下してもホメオスタシスを維持することを示唆する．さらに，ヒトのiPS由来神経細胞を低温処理すると，TGSのそれとは異なり，微小管構造が断片化し，破壊されてしまうが，低温処理時にミトコンドリアの脱共役剤を添加し，膜電位の上昇を抑制するとROSの発生が抑えられ，細胞骨格の崩壊を防ぐ（Ou et al., 2018）．従って，非冬眠哺乳類細胞においては低温時のミトコンドリアの機能異常がROSの上昇を引き起こし，細胞死の引き金となる可能性が考えられる．

それでは冬眠哺乳類の細胞はどのようにしてそれを回避しているのだろうか？　この遺伝子基盤に切り込んだ数少ない研究を紹介する．ホッキョクジリス（AGS）の神経前駆細胞で発現する遺伝子を組み込んだcDNA発現ライブラリーを用いて，マウスの神経前駆細胞にマイルドな低温ストレス（31℃）を含む種々のストレスに対する耐性を与える遺伝子をスクリーニングした実験の結果，ATP5G1が同定された（Singhal et al., 2020）．ATP5G1はミトコンドリアのATP合成酵素の構成因子であり，N末側に複数のAGS特異的なアミノ酸置換が存在する．そのうちの一つ（32番ロイシン）をミミックした変異ヒトATP5G1（Hu ATP5G1^{P32L}）を過剰発現すると，AGS ATP5G1と同様ヒト神経前駆細胞に31℃の低温ストレスへの耐性をもたらした．さらにゲノム編集技術によりAGS神経前駆細胞においてATP5G1の32番ロイシンをヒト型に変異させる（ATP5G1^{L32P}）とそのようなストレス耐性が若干減弱した．AGS ATP5G1がいかにしてストレス耐性を与えるか不明であるが，ミトコンドリア予備呼吸能（脱共役剤存在下で測定されるミトコンドリアの最大呼吸量）の増加との関連が示唆された（Singhal et al., 2020）．一方で，私たちが調べたところATP5G1の32番ロイシンはハムスターには保存されておらず，これが冬眠哺乳類に共通した低温耐性メカニズムとは考えにくい（未発表データ）．

Staplesらは，深冬眠期および中途覚醒期のTGSの肝臓から単離されたミトコンドリアを用いてState3呼吸能（ミトコンドリアが呼吸するのに必要な基質と高濃度のADPの存在下で測定される，共役状態での最大呼吸能）を37℃で測定すると，深冬眠期のミトコンドリア呼吸能が中途覚醒期に比べて低いこと，そしてそれは電子伝達系（electron transport chain，ETC）複合体IおよびIIの活性低下に起因することを明らかにした（Mathers et al., 2017）．深冬眠期から中途覚醒期に向かう際のミトコンドリア呼吸能は体温上昇と相関するように活性化

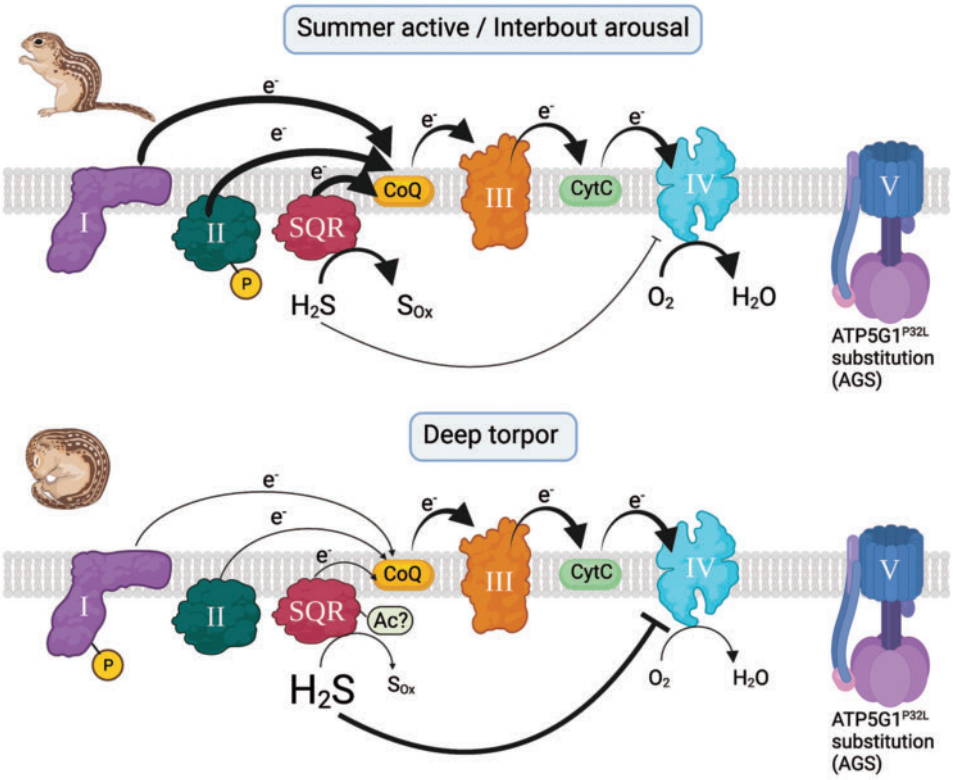


図 2：TGS のミトコンドリア電子伝達系複合体 I-IV および硫化水素分解酵素 SQR の活性についての活動期 / 中途覚醒期と深冬眠期の比較（Jensen et al., 2021; Mathers & Staples, 2019）．また AGS では複合体 V 構成タンパク質のアミノ酸置換がストレス耐性に関わるとの報告がある（Singhal et al., 2020）．

することから，低下した呼吸能の回復については体温の上昇に依存する可能性が示唆された（Armstrong & Staples, 2010）．一方で，中途覚醒期から深冬眠期に移行する際には，深冬眠開始直後の体温がまだ下がり始めたばかりの時期に，ミトコンドリア呼吸能はすでに最低体温の時期と同等の強い抑制を受けている（Chung et al., 2011; Staples, 2014）．従って，ETC 複合体 I と II の活性低下は，体温低下の結果もたらされるものではなく，むしろ代謝抑制のための能動的制御により体温低下に先んじて起こると考えられる．

そのメカニズムとして翻訳後修飾による深冬眠期の ETC 複合体 I および II の活性抑制機構が提唱された．Staples らは肝臓のミトコンドリアタンパク質の 2 次元電気泳動と質量分析により複数のタンパク質のリン酸化およびアセチル化状態が深冬眠期と中途覚醒期で異なることを見出した（Mathers & Staples, 2019）．中でも，リン酸化が，深冬眠期に顕著に増加するタンパク質として ETC 複合体 I の 75kDa サブユニットが，中途覚醒期に顕著に増加するタンパク質として ETC 複合体 II のフラボタンパク質サブユニットが同定された．ミトコンドリアホモジネートの脱リン酸化処理によって，深冬眠期の複合体 I の活性が上昇し，中途覚醒期の複合体 II の活性が減少したことから，これらの ETC 複合体タンパク質のリン酸化が冬眠期のミトコンドリア呼吸能のダイナミクスに重要な役割を果たすことが示唆された（図 2）（Mathers & Staples, 2019）．

高濃度の硫化水素（H_2S）は ETC 複合体 IV を阻害する．H_2S をマウスに吸引させると代謝を低下させ，一過性に冬眠のような仮死状態を誘導するという衝撃的な報告があるが，その後，大型哺乳類にはそのような効果が認められなかったことなどからヒトへの応用については懐疑的な見方が広まっている（Blackstone et al., 2005; Jensen & Fago, 2021）．一方で，細胞内においてもシステイン合成などの副産物として H_2S は内因性に合成される．TGS の肝臓では深冬眠期の H_2S の濃度が夏季あるいは中途覚醒期と比較して 2 倍程度上昇しており，その原因はミトコンドリア局在性の H_2S 分解酵素である SQR（sulfide quinone reductase）の活性が抑制されることにある（Jensen et al., 2021）．そのため，深冬眠期の肝臓から単離されたミトコンドリアを H_2S に曝露すると，分解が遅いために長時間にわたって呼吸量の著しい活性低下が認められた．この論文の著者らはこれが SQR の

アセチル化によるものと予想しているが，まだ証明されてはいない．以上より *in vivo* における深冬眠期のミトコンドリア活性は，これまでの H_2S 非存在下で測定した *in vitro* の実験データに基づいて考えられていたよりも強く抑制されている可能性がある（図 2）．

これら Staples のグループを中心とした一連の研究により，TGS では深冬眠時のミトコンドリア呼吸が能動的に不活化されることが明らかとなり，それは低温における ROS の抑制に寄与するものと予想された．しかしながら，深冬眠時の TGS から単離されたミトコンドリアの ROS 発生量を夏の活動期や中途覚醒時のそれと比較した場合，一部条件下では有意に低下するものの，ほとんどの条件下では低下するとは言えない（Brown et al., 2012）．こうした意外な結果は，上述の H_2S レベルがそうであったように単離したミトコンドリアから発生する ROS を測定する際の実験条件が，生体の細胞内環境を正確に再現していないことによる可能性もあり，深冬眠時の翻訳後修飾を介した ETC 複合体の抑制が ROS の低減に寄与しないと結論するのは早計である．

一方，低温に脆弱なヒトがん細胞を用いた研究からも，低温誘導性細胞死へのミトコンドリアの関与が示唆される．ヒトがん細胞株において低温誘導性細胞死を制御する遺伝子を同定する目的で CRISPR ライブラリーの網羅的スクリーニングをしたところ，ミトコンドリア内膜に局在しマトリックスへの Ca^{2+} の輸送を正に制御する MICU1 が同定された（Nakamura et al., 2021）．MICU1 遺伝子を欠損したヒトがん細胞株では低温培養時でも過酸化脂質が蓄積せず，細胞死も顕著に抑制される．その抑制メカニズムとしては，MICU1 欠損によるミトコンドリアマトリックス内 Ca^{2+} 濃度の減少と，低温誘導性のミトコンドリア過分極の抑制が提唱されている．実際に，細胞質内の Ca^{2+} をキレートする（この時ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度も減少する），あるいは脱共役剤などでミトコンドリア膜電位を下げることで低温誘導性細胞死が抑制される．興味深いことに，MICU1 機能阻害や Ca^{2+} キレーターは，37℃ でのシスチン輸送タンパク質（xCT）の阻害剤によりグルタチオンを枯渇させた場合に誘導されるフェロトーシスは抑制しない．このことから，ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度異常がフェロトーシスの原因となるのは低温誘導性細胞死に特異的であるかもしれない．ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度を低下させるとなぜ低温誘導性細胞死が抑制されるのかについて，論文の著者らは Ca^{2+} 依存性の ETC 複合体の活性が減少し ROS が減少するためであるとの仮説を立てている（Nakamura et al., 2021）．また，同論文ではヒト細胞株において低温により活性化される温度感受性 Ca^{2+} チャネルである TRPM8（齋藤らの稿を参照）が低温環境下での細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇および低温誘導性細胞死に寄与することが示唆された．神経細胞において TGS やハムスターの TRPM8 をマウスやラットのそれと比較すると低温感受性が低いとの報告がある（Matos-Cruz et al., 2017）．従って TRPM8 の低温感受性の低下が冬眠哺乳類の神経細胞が低温で脱分極を引き起こすことを防ぐのみならず，冬眠哺乳類の細胞一般において低温誘導性細胞死の回避に寄与する可能性もある．

3.2 ミトコンドリア以外から発生する ROS

低温環境において哺乳類細胞のフェロトーシス様細胞死を引き起こす ROS の発生源がミトコンドリアの他に存在する可能性もある．低温により引き起こされるものではないが，フェロトーシスの際の ROS の発生源に関する先行研究をいくつか紹介する．まず，小胞体に存在するシトクロム P450 酸化還元酵素（P450 oxidoreductase，POR）が ROS を発生させ，フェロトーシスの要因となることが発見された（Yan et al., 2021; Zou, Li, et al., 2020）．POR は NADPH から電子を受け取りシトクロム P450，ヘム酸化酵素，スクアレン酸化酵素など様々な酸化酵素へ電子を受け渡して還元し，全体として細胞内の種々の基質を酸化することによって分解するシステムとして働くことが知られる．しかし，こうした本来の役割である酸化酵素の還元とは無関係に POR は NADPH 依存的に H_2O_2 を発生し，それが膜脂質を攻撃して過酸化脂質を生み出し，フェロトーシスの端緒となりうる（Yan et al., 2021）．同じく，ペルオキシソーム内で合成されるエーテル結合型リン脂質がフェロトーシスの原因となりうることも報告された．（Zou, Henry, et al., 2020）．この報告では ROS の発生源については調べられていないが，ペルオキシソームで H_2O_2 が産生される点を考慮すると，低温などのストレスにより細胞質に H_2O_2 が漏れ出してフェロトーシスの引き金となる可能性も考えられる．他には，主に細胞質で遊離した多価不飽和脂肪酸を酸化する 5-LOX，12-LOX，15-LOX と呼ばれる脂質酸化酵素群（lipoxygenases）が，膜のリン脂質も基質とすることがあり，それがフェロトーシスの原因となる現象が知られる（Shah et al., 2018; Shintoku et al., 2017; Wenzel et al., 2017）．

以上のように，細胞内の様々な因子により ROS が発生し脂質を酸化させ，フェロトーシスを引き起こしうる．低温環境において，哺乳類細胞のフェロトーシス様細胞死を起こす ROS が何に起因するのか，そして，冬眠哺乳

類はどのようなメカニズムでその発生を抑制しているのか，今後の研究による解明が期待される．

4．冬眠哺乳類細胞における酸化脂質の除去機構

グルタチオンの還元力を利用して ROS の還元を行う Gpx ファミリータンパク質は脊椎動物には 8 個存在するが，先に述べた Gpx4 は他の Gpx タンパク質とは異なるユニークな特徴を持つ．つまり，Gpx4 は他の多くの Gpx が 4 量体として機能するのに対し単量体として働くこと，他の Gpx に存在し基質の活性中心へのアクセスを制限すると考えられるタンパク質表面のループ構造を欠いていることが挙げられる（Savaskan et al., 2007; Scheerer et al., 2007）．こうした特徴から Gpx4 は幅広い ROS を基質とするが，特に過酸化脂質を直接還元するという他のタンパク質にはない機能を有する．そのため生存に不可欠で，*Gpx4* を欠損したマウスは胚発生初期（E7.5）に致死となる（Yant et al., 2003）．一般的な細胞では Gpx4 は選択的転写開始点の違いにより細胞質局在型およびミトコンドリア局在型の 2 つのフォームが発現し，活性中心付近の正に帯電した領域でリン脂質の頭部と相互作用することで生体膜にリクルートされ，膜表面から飛び出た過酸化脂質鎖を還元するモデルが提唱されている（Cozza et al., 2017）．また，Gpx ファミリータンパク質には Gpx4 を含め活性中心にセレノシステイン残基を持つものと，システイン残基を持つものが存在するが，Gpx4 をシステイン型に置き換えた $Gpx4^{Cys/Cys}$ マウスは生後 2，3 週間で致死となる（Ingold et al., 2018）．それはシステイン型 Gpx4 が H_2O_2 等水溶性 ROS により不可逆的に酸化されることで過酸化脂質が還元できなくなるためと考えられ，Gpx4 のセレノシステイン残基の重要性を示唆する．以上のように，Gpx4 は過酸化脂質除去に働く，フェロトーシス抑制の要となるタンパク質であるが，冬眠哺乳類の低温耐性に関する Gpx4 の役割について報告はない．

近年，心筋梗塞などの血栓症や臓器移植などの医療場面で，血流が一時的に低下した後に回復すると細胞内で ROS が大量に発生し，フェロトーシスにより臓器傷害を引き起こすことを示す知見が蓄積している（Lillo-Moya et al., 2021; Yan et al., 2020）．そして，ミトコンドリア局在型 Gpx4 を過剰発現するとマウスにおいてこうした虚血再灌流傷害に対する耐性を高めるとの報告がある（Dabkowski et al., 2008）．AGS のような冬眠哺乳類は，通常体温においても全身性の虚血再灌流傷害に対する耐性があることが知られる（Bogren et al., 2014）．この冬眠哺乳類特有の耐性能力は，一過性に無酸素（＋無糖）環境に曝露し，酸素を再供給する実験系により培養皿上で再現される（Bhowmick & Drew, 2017）．腎臓の初代培養細胞を用いた虚血再灌流傷害モデルでは，無酸素時の Gpx4 の発現誘導と，酸素再供給時の xCT およびフェリチン（鉄イオン貯蔵タンパク質）の発現誘導の程度がマウスに比べハムスター細胞で高いことが報告されており，フェロトーシス抑制との関連が示唆された（Eleftheriadis et al., 2019）．しかしながら，転写と翻訳が不活性な低温環境下で発生する過酸化脂質の抑制にこのような発現制御機構が機能するかどうかは不明である．

5．冬眠哺乳類細胞における脂質酸化連鎖反応の抑制機構

フェロトーシスを回避する機構として，Gpx4 による直接的な過酸化脂質除去機構の他に，生成された過酸化脂質や過酸化脂質ラジカルから新たな脂質へと酸化反応が拡大していく連鎖を止める機構がある．

私たちの研究室では，冬眠期・非冬眠期によらずハムスターの肝臓から作製した初代培養細胞が 4℃で 5 日以上生存することを見出した（図 3A）（Anegawa et al., 2021）．これはマウスの初代肝細胞が 4℃，2 日でほぼ死滅するのとは対照的であった．しかしながら，偶然にも私たちの研究室が現所属大学へ移動したことをきっかけとしてハムスター肝細胞がマウスと同様の低温に対する脆弱性を示すようになった．この原因が何か，動物飼育に関する様々な要因を検討した結果，ハムスターに与える餌を変えたことが原因であった．すなわち，ある種の餌（日本農産 MR スタンダード餌，以下 STD 餌）で飼育したハムスターの肝細胞は低温誘導性細胞死を起こさないが，異なる餌（日本農産 MR ストック餌，以下 STC 餌）で飼育したハムスターの肝細胞は 2 日間で低温誘導性細胞死を起こした（図 3B）．STC 餌で飼育したハムスター肝細胞を低温に曝露した際，脂溶性抗酸化剤や鉄イオンキレーターで細胞死が抑制されること，過酸化脂質が蓄積することから，やはりフェロトーシス経路が活性化すると考えられた（図 3C）．STC 餌と STD 餌に含まれるどの栄養素の差が肝細胞の表現形の違いを生み出すのか調べるため，両者の成分表を比較した．いくつか含有量の異なる栄養素が存在したが，STC 肝細胞の低温誘導性細胞死がフェロトーシスであることを考え合わせ，STC 餌に比べ STD 餌にはビタミン E が 4 倍以上多く含まれることに着目した．ビタミン E は脂溶性のラジ

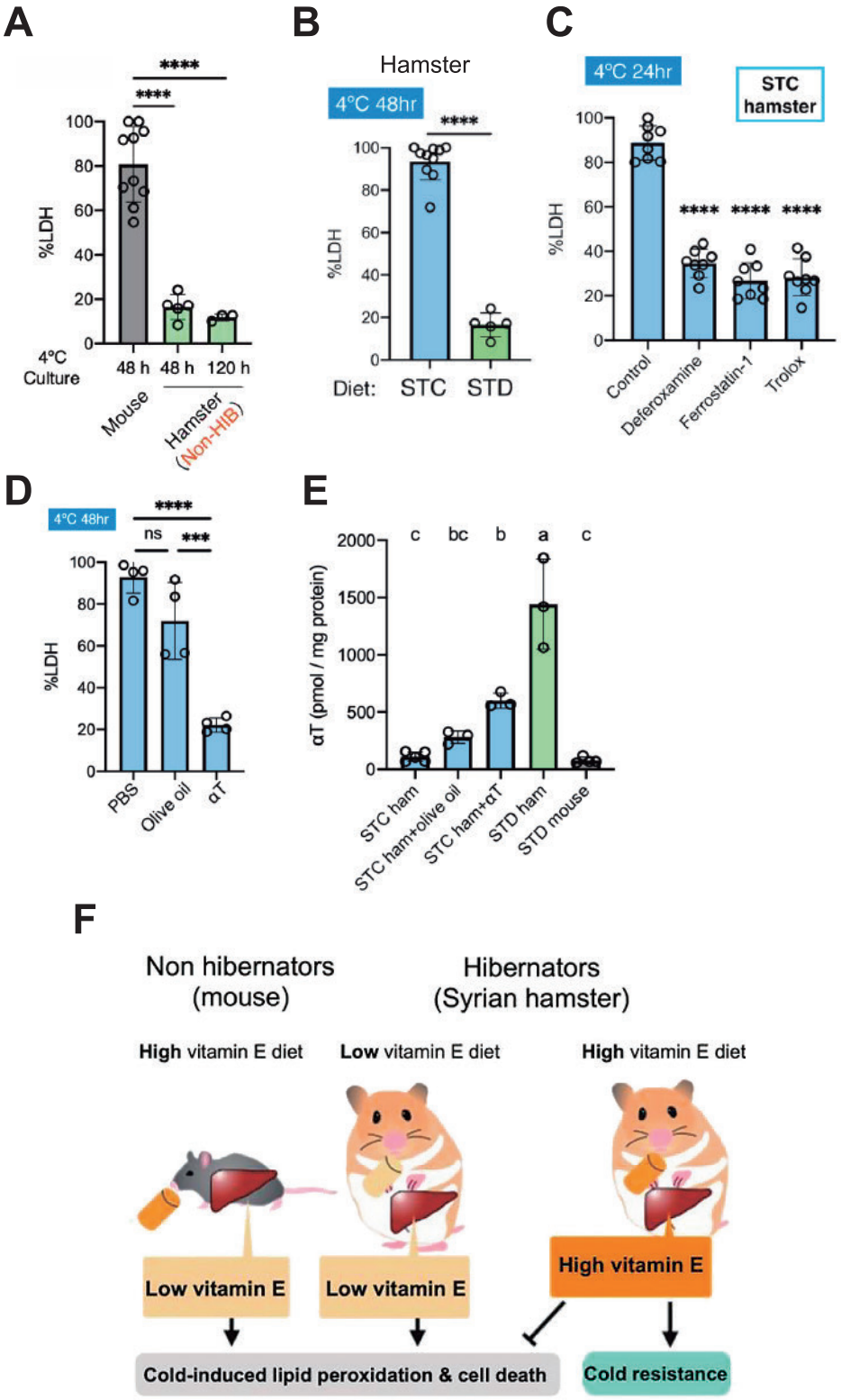


図 3：(A-D) LDH 法により測定した，4℃処理した初代培養肝細胞の死細胞割合．(A) マウスとハムスター肝細胞の比較．****p＜0.0001（Two-tailed Welch's t-test）(B) STC 餌と STD 餌を与えたハムスターの肝細胞の比較．****p＜0.0001（Two-tailed Welch's t-test）(C) STC 餌を与えたハムスターの肝細胞低温処理におけるフェロトーシス阻害剤の効果．Deferoxamine：鉄キレーター，Ferrostatin-1，Trolox：脂溶性抗酸化剤．****p＜0.0001（One-way ANOVA with the Tukey's multiple comparison test）．(D) STC 餌とともに与えた添加物の効果．αT：ビタミン E（α トコフェロール）．****p＜0.0001, ***p＜0.001, ns p＞0.05（One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test）．(E) LC-MS で計測した，表示した餌および添加物を与えた動物の肝細胞が含有するビタミン E 量．a，b，c の文字は統計的有意性を示し，文字を共有しない場合は統計的優位（p＜0.05）に異なる（One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test）．(F) マウスとハムスターの肝細胞における餌含有ビタミン E に依存した低温耐性能力の違いについてのモデル．
Anegawa et al., 2021 を一部変更して引用．

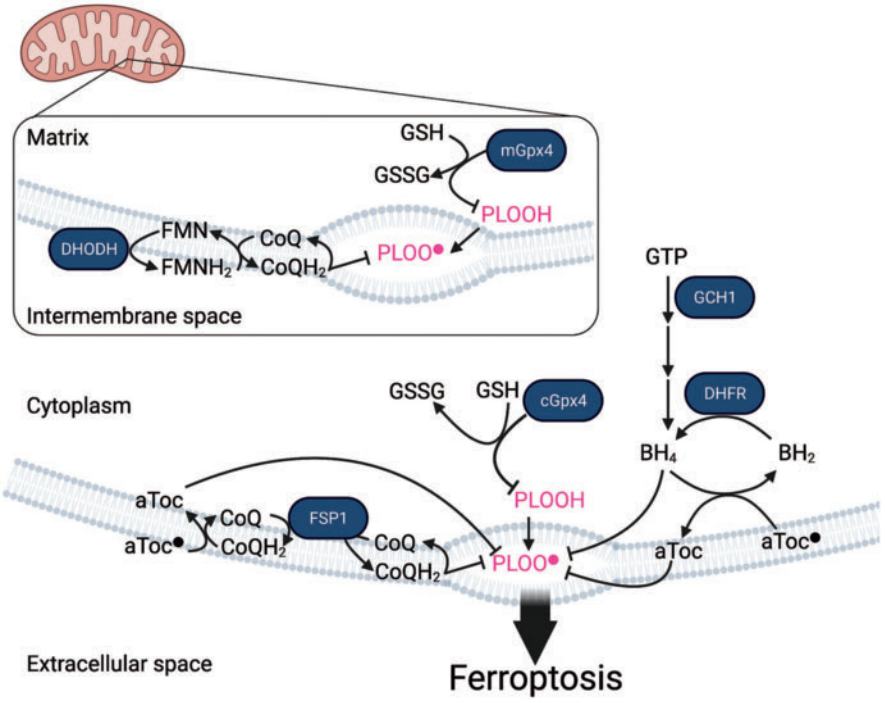


図 4：フェロトーシス抑制システムについての模式図．タンパク質を紺色の楕円で示す．それぞれの物質名の右肩に●の表示があるものはラジカル体を示す．$CoQH_2$ および BH_4 には，直接的あるいはαトコフェロールを介して間接的に過酸化脂質ラジカルを抑制する作用がある．aToc：αトコフェロール，BH_2：酸化型ビオプテリン，BH_4：還元型ビオプテリン，cGpx4：細胞質局在 Gpx4，CoQ：酸化型補酵素 Q，$CoQH_2$：還元型補酵素 Q，DHFR：ジヒドロ葉酸レダクターゼ，DHODH：ジヒドロオロト酸脱水素酵素，FMN：酸化型フラビンモノヌクレオチド，$FMNH_2$：還元型フラビンモノヌクレオチド，FSP1：フェロトーシス抑制タンパク質 1，GCH1：GTP シクロヒドラーゼ 1，GSH：還元型グルタチオン，GSSG：酸化型グルタチオン，GTP：グアニン 3 リン酸，mGpx4：ミトコンドリア局在 Gpx4．

カル捕捉抗酸化物質（radical trapping antioxidant, RTA）として古くから知られ，過酸化脂質ラジカルが他の脂質へと連鎖的に酸化反応を起こし伝播することを防ぐ天然のフェロトーシス阻害剤である（Carlson et al., 2016; Shah et al., 2019）（図 1）．実際，STC 餌に加えてビタミン E（正確には複数あるビタミン E 同族体のうち哺乳類生体での活性が高いαトコフェロール）をハムスターに与えると初代肝細胞の低温誘導性細胞死が抑制されたことから，餌のビタミン E 含有量の差が低温誘導性細胞死の表現形の違いの原因であることが示唆された（図 3D）．面白いことに，同じ STD 餌を与えた場合でも，肝細胞中に含まれるビタミン E 量はマウスの方がハムスターに比べて 10 分の 1 以下と非常に低かった．これらの結果から，ハムスターにはマウスよりもビタミン E を肝臓組織中に高濃度で蓄える仕組みが備わっていることが示唆された（図 3E）．以上より，ハムスターのような小型冬眠哺乳類は，脂溶性抗酸化物質であるビタミン E を組織中に蓄えることで，深冬眠時の低体温によって惹起されうるフェロトーシスを防止するという仮説が浮上した（図 3F）．これは自然界において夏から秋にかけて多く生産される種子や堅果類にビタミン E が豊富に含まれることを考えると理にかなった適応戦略のように思われる．また最近，生体において止血因子の合成経路に重要な役割を担うことがよく知られるビタミン K が，止血経路とは無関係に RTA としてフェロトーシスを強力に抑制することが報告された（Mishima et al., 2022）．ビタミン K もビタミン E と同じく脂溶性ビタミンであり，冬眠哺乳類の低温耐性に寄与する可能性がある．

Gpx4 と独立して働くフェロトーシス抑制機構の存在も最近の研究で相次いで発見された（図 4）．①形質膜 CoQ 還元経路：ミトコンドリア電子伝達系において電子のキャリアとして働く補酵素 Q（CoQ）は，形質膜にも存在することが古くから知られていたもののその意義は不明であった．FSP1（Ferroptosis suppressor protein1，別名 Aifm2）は細胞形質膜に局在し，NAD（P）H 依存的に CoQ を $CoQH_2$ へと還元し，$CoQH_2$ が過酸化脂質を還元するというサイクルを形成することで，フェロトーシス抑制に寄与する（Bersuker et al., 2019; Doll et al.,

2019）．また，FSP1 はビタミン E とビタミン K をそれぞれ間接的，直接的に還元する働きもあることが示唆されており（Doll et al., 2019; Mishima et al., 2022），FSP1 はこれら脂溶性ビタミンと相乗的にフェロトーシスを防ぐといえる．②ビオプテリン経路：チロシン水酸化酵素（ドーパミンなどの合成に関わる）を含む複数の酵素の補酵素として重要であることが知られるビオプテリンが膜の脂質過酸化を直接的，あるいはビタミン E を介して間接的に抑制することでフェロトーシスを防ぐという経路も存在する（Kraft et al., 2020; Soula et al., 2020）．様々ながん細胞株について調べるとビオプテリン合成の律速酵素である GCH1（GTP cyclohydrolase 1）の発現量がフェロトーシス誘導剤に対する抵抗性に相関するなど，この経路のフェロトーシス抑制における重要性が示唆された．③ミトコンドリア CoQ 還元経路：ミトコンドリア内膜においてウリジン合成経路に関わる DHODH（Dihydroorotate dehydrogenase）は，間接的に CoQ を還元することでミトコンドリアにおける過酸化脂質の蓄積を抑え，フェロトーシスの抑制に働く（Mao et al., 2021）．また，ミトコンドリア局在型グリセロール 3 リン酸脱水素酵素 2（GPD2）も同様の作用を持つことが報告された（Wu et al., 2022）．これらの結果から，形質膜に加えてミトコンドリアにおいても $CoQH_2$ を介した過酸化脂質の還元がフェロトーシスの抑制に重要であることが示唆される．これらの Gpx4 非依存的なフェロトーシス抑制経路を担うタンパク質群が冬眠哺乳類の低温耐性に関与するかについては未だ報告はない．

6．臓器機能の低温耐性

小型哺乳類が極端な低体温となる深冬眠時には，循環器や呼吸器はペースを極端に低下させながらも生命を維持するため活動を続けている．また，それら活動の制御のため，あるいは外部刺激の受容とそれに対する応答や周期的な中途覚醒の発動のため，神経系の一部のネットワークは活動している（Sonntag & Arendt, 2019）．こうした組織では低温において細胞死を起こさないというだけでは十分ではなく，その臓器機能を維持する必要がある．以下, いくつかの臓器機能に関する研究を紹介する．

①心臓：心筋の収縮は，洞房結節から伝播した活動電位により形質膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャネルから Ca^{2+} が流入することで開始する．それにより筋小胞体が Ca^{2+} を放出し，増加した細胞内 Ca^{2+} に依存して筋原繊維が滑り運動を起こすことで心筋が収縮する．そして，Ca^{2+} の細胞外への排出と筋小胞体への再取り込みにより細胞内の Ca^{2+} 濃度が低下して心筋は再び弛緩する．非冬眠哺乳類の心臓を低温に曝すと休止期の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇してしまい，このような収縮-弛緩サイクルを起こすことができず機能不全に陥る（Wang et al., 2002）．この原因は低温によって電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口時間が伸びて過度の Ca^{2+} が流入することであるが，冬眠哺乳類の冬眠期の心筋ではこのチャネルが発現低下し，またタンパク質レベルでリン酸化などにより不活性化されており，Ca^{2+} の流入を防ぐ（Kokoz Yu et al., 2000; Kondo, 1986; Yatani et al., 2004）．通常 Ca^{2+} の流入が低下すると心筋の収縮が弱まるが，冬眠期の心筋では筋小胞体上の Ca^{2+} トランスポーター（SERCA2a）の発現量上昇と筋小胞体の体積増加により Ca^{2+} 貯蔵量を増やし，収縮時には大量の Ca^{2} を細胞質に放出することによって，活動期よりもむしろ高い収縮力を発揮する（Rosenquist, 1970; Skepper & Navaratnam, 1995; Yatani et al., 2004）．このように冬眠哺乳類の心筋は外部からの Ca^{2+} の流入を抑え，筋小胞体-細胞質間の Ca^{2+} のフローを増大することで冬眠期の収縮-弛緩サイクルを維持すると考えられる．

②脳神経系：深冬眠期には電気生理学的計測により活動電位が観察されなくなるなどほとんどの神経細胞は活動を停止する，または非常に低下させる（Krilowicz et al., 1988）．それは低温による受動的な機能低下によって大部分は説明されるが，能動的な抑制機構も存在する．冬眠哺乳類では，TRPM8 や cGMP 依存性陽イオンチャネルの CNGA3 といった低温に対する温度受容体の感受性が低いことや（Feketa et al., 2020; Matos-Cruz et al., 2017），冷感や痛覚を担う末梢感覚神経の一部の電位依存性 Na^{+} チャネルを介した活動電位形成が深冬眠時に抑制されることから（Hoffstaetter et al., 2018），深冬眠における低温によって神経細胞が脱分極しないような制御機構の存在が考えられる．また，AGS の海馬の神経細胞は深冬眠時にグルタミン酸作動性陽イオンチャネルである NMDA 受容体が脱リン酸化し膜移行が抑制されることで，その応答性が抑制されており（Zhao et al., 2006），無酸素・無糖環境において細胞保護的に働くと考えられる（Ross et al., 2006）．一方で，血圧を感知し血圧反射に重要な役割を果たす圧受容神経細胞から脳幹の孤束核に存在する 2 次神経細胞へのシナプス伝達強度は，計測したどの温度でもハムスターの方がラットより 2 倍程度高い（Sekizawa et al., 2012）．低温（15℃）において，これらの神経細胞間の NMDA 受容体依存的シナプス電流はハムスターの方が高いが，ハムスターでは（特に冬眠期に）非 NMDA 受容体による興奮性シナプス後電流

の消失が早く，それによりNMDA受容体の開口タイミングを制限する可能性がある（Sekizawa et al., 2013）．こうしたハムスターの圧受容神経-脳幹の接続特性は深冬眠期に特有の間欠的な心臓の拍動を維持するのに重要な働きをするのかもしれない．また，冬眠哺乳類の海馬の神経細胞では深冬眠期の低体温により微小管結合タンパク質Tauのリン酸化が起こり，スパインの数が減少するなど細胞形態上の退縮が観察されるが，中途覚醒期にはそれが回復し，深冬眠前の記憶も保持される（Horowitz & Horwitz, 2019）．このような可逆性を可能とする分子メカニズムは不明であるが，低温誘導性RNA結合タンパク質（RNA binding motif protein 3, RBM3）の関与が示唆されている（Peretti et al., 2015）．その他，TGSの神経細胞では冬眠時にミトコンドリア脱共役タンパク質（Uncoupling protein 1，Ucp1）が発現誘導され，局所的な熱産生を行うことで深冬眠中の機能を維持するという仮説も提唱されている（Laursen et al., 2015）．

③肺：肺の肺胞表面には肺サーファクタントと呼ばれる界面活性物質が存在し，そのおかげで肺胞が表面張力によって潰れず，また，吸気時に肺が膨らむのに必要なエネルギーが少なくて済む（Perez-Gil, 2008）．TGSの肺サーファクタントは，ブタと比較して低温での活性が優れること，冬眠期には活動期に比べ不飽和脂質成分が増えることなどが報告されており，これらの特性は低温での肺機能の維持に重要であるかもしれない（Suri et al., 2012）．

7．全身性の低温耐性

深冬眠期および中途覚醒期には様々な臓器で，脂質およびタンパク質の酸化レベルが上昇する（Duffy & Staples, 2022）．こうした冬眠期の酸化ストレスを低減しうる抗酸化酵素や低分子量ROSスカベンジャーの血中や脳脊髄液中における量について調べられてきた（Drew et al., 2002）．水溶性の抗酸化物質であるビタミンC（アスコルビン酸）は深冬眠期においてAGSとTGSの血中で3〜5倍，およびAGSの脳脊髄液中で2倍程度増加するが，同じく抗酸化作用のあるグルタチオンは変化しない（Drew et al., 1999）．興味深いことに増加したビタミンCは中途覚醒期の呼吸量の増加とともに急速に消費される（Toien et al., 2001）．また，血中ビタミンC量の低下と呼応して血中の尿素の量が増加する．尿素はキサンチン酸化酵素による核酸の分解反応によって生じるが，その際フリーラジカルやH_2O_2を産生することから，ビタミンCは血中や脳脊髄液中でこうしたROSを消去するのに用いられるという解釈が成り立つ．実際，ハムスターの脳においてマイクロダイアリシスを用いた解析で，キサンチン酸化酵素の阻害剤を投与すると，中途覚醒期に細胞外液中のビタミンCの消費が抑えられるという報告があり，この仮説を支持している（Osborne & Hashimoto, 2007）．一方，ビタミンCはヒト，サル，モルモットなど一部を除く多くの脊椎動物では主に肝臓で合成されるが，ビタミンCの合成には等molのグルタチオンが必要とされるとの報告もあり，ビタミンCの増産が肝臓にとってフェロトーシス誘引性の負荷となることも考えられる（Banhegyi et al., 1996）．また，ハムスター血中においてカタラーゼによるH_2O_2の分解活性が中途覚醒時に上昇し，H_2O_2による細胞死を抑制することが示唆されている（Ohta et al., 2006）．

8．おわりに

深冬眠時の小型冬眠哺乳類が，体温を極端に低く維持しながらほとんど何の傷害も受けないという優れた低温耐性能力は，古くから人々の強い興味を惹いてきた．ヒトがん細胞を用いた研究から低温における細胞死は，脂質の酸化によって引き起こされるフェロトーシスと呼ばれる細胞死に近いことが近年明らかとなった．私たちの研究から，ハムスターは天然のフェロトーシス阻害剤であるビタミンEを組織中に高保持する能力を備えており，それによって冬眠期の細胞傷害性ストレスに対処する可能性が示唆された．さらに冬眠哺乳類に由来する培養細胞株は，同条件で継代を重ねても非冬眠哺乳類の細胞株に比べて高い低温耐性を持つことから，外部栄養に依らない低温耐性能力も備えると考えられる．こうした細胞自律的な能力を支える分子基盤については，近年急速に発展したゲノム編集技術を用いたスクリーニングシステムの応用や，がん研究分野の知見を流用することで，そう遠くない将来に明らかになると期待される．一方で，そうした細胞自律的な低温耐性能力が実際の冬眠に関与するかの解明や，深冬眠時の循環器や呼吸器，神経系の臓器機能を維持するメカニズム，さらにそうしたメカニズムを発動するための活動期から冬眠期への身体の作り替えのメカニズムの解明には，時間とコストを必要とする個体レベルでの解析が必須となるため，より多くの困難が伴うと予想される（図5）．しかしながら，近年の技術的進歩により，冬眠哺乳類のゲノム情報を活用しRNA-seq解析やプロテオーム解析などにより重要な遺伝子を絞り込んだうえで，ゲノム編集技術により逆遺伝

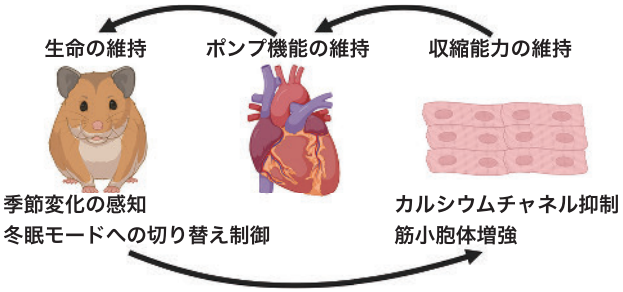


図 5：心臓を例とした，冬眠哺乳類の異なる階層の低温耐性能力．

学的に遺伝子機能を解析することが可能となった今，こうした高次の低温耐性能力についてもまた徐々に解き明かされていくであろう．

参考文献

Anegawa, D., Sugiura, Y., Matsuoka, Y., Sone, M., Shichiri, M., Otsuka, R., Ishida, N., Yamada, K. I., 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 alpha-tocopherol. *Commun Biol*, **4**(1), 796. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02297-6

Armstrong, C., & Staples, J. F. (2010). The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *J Comp Physiol B*, **180**(5), 775-783. https://doi.org/10.1007/s00360-010-0444-3

Banhegyi, G., Csala, M., Braun, L., Garzo, T., & Mandl, J. (1996). Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver. *FEBS Lett*, **381**(1-2), 39-41. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00077-4

Barnes, B. M. (1989). Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science*, **244**(4912), 1593-1595. https://doi.org/10.1126/science.2740905

Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, **575**(7784), 688-692. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2

Bhowmick, S., & Drew, K. L. (2017). Arctic ground squirrel resist peroxynitrite-mediated cell death in response to oxygen glucose deprivation. *Free Radic Biol Med*, **113**, 203-211. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.024

Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, **308**(5721), 518. https://doi.org/10.1126/science.1108581

Bogren, L. K., Olson, J. M., Carpluk, J., Moore, J. M., & Drew, K. L. (2014). Resistance to systemic inflammation and multi organ damage after global ischemia/reperfusion in the arctic ground squirrel. *PLoS One*, **9**(4), e94225. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094225

Brown, J. C., Chung, D. J., Belgrave, K. R., & Staples, J. F. (2012). Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **302**(1), R15-28. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00230.2011

Carlson, B. A., Tobe, R., Yefremova, E., Tsuji, P. A., Hoffmann, V. J., Schweizer, U., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., & Conrad, M. (2016). Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol*, **9**, 22-31. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.003

Chung, D., Lloyd, G. P., Thomas, R. H., Guglielmo, C. G., & Staples, J. F. (2011). Mitochondrial respiration and succinate dehydrogenase are suppressed early during entrance into a hibernation bout, but membrane remodeling is only transient. *J Comp Physiol B*, **181**(5), 699-711. https://doi.org/10.1007/s00360-010-0547-x

Conrad, M., & Pratt, D. A. (2019). The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, **15**(12), 1137-1147. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0408-1

Cozza, G., Rossetto, M., Bosello-Travain, V., Maiorino, M., Roveri, A., Toppo, S., Zaccarin, M., Zennaro, L., & Ursini, F. (2017). Glutathione peroxidase 4-catalyzed reduction of lipid hydroperoxides in membranes: The polar head of membrane phospholipids binds the enzyme and addresses the fatty acid hydroperoxide group toward the redox center. *Free Radic Biol Med*, **112**, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.010

Dabkowski, E. R., Williamson, C. L., & Hollander, J. M. (2008). Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free Radic Biol Med*, **45**(6), 855-865. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.021

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149**(5), 1060-1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Goya Grocin, A., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourao, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., . . . Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, **575**(7784), 693-698. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0

Drew, K. L., Osborne, P. G., Frerichs, K. U., Hu, Y., Koren, R. E., Hallenbeck, J. M., & Rice, M. E. (1999). Ascorbate and

glutathione regulation in hibernating ground squirrels. *Brain Res*, **851**(1–2), 1–8. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01969-1

Drew, K. L., Toien, O., Rivera, P. M., Smith, M. A., Perry, G., & Rice, M. E. (2002). Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **133**(4), 483–492. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00118-7

Duffy, B. M., & Staples, J. F. (2022). Arousal from Torpor Increases Oxidative Damage in the Hibernating Thirteen-Lined Ground Squirrel (Ictidomys tridecemlineatus). *Physiol Biochem Zool*, **95**(3), 229–238. https://doi.org/10.1086/719931

Eleftheriadis, T., Pissas, G., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2019). Factors that May Protect the Native Hibernator Syrian Hamster Renal Tubular Epithelial Cells from Ferroptosis Due to Warm Anoxia-Reoxygenation. *Biology (Basel)*, **8**(2). https://doi.org/10.3390/biology8020022

Feketa, V. V., Nikolaev, Y. A., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2020). CNGA3 acts as a cold sensor in hypothalamic neurons. *Elife*, **9**. https://doi.org/10.7554/eLife.55370

Hattori, K., Ishikawa, H., Sakauchi, C., Takayanagi, S., Naguro, I., & Ichijo, H. (2017). Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway. *EMBO Rep*, **18**(11), 2067–2078. https://doi.org/10.15252/embr.201744228

Hendriks, K. D. W., Joschko, C. P., Hoogstra-Berends, F., Heegsma, J., Faber, K. N., & Henning, R. H. (2020). Hibernator-Derived Cells Show Superior Protection and Survival in Hypothermia Compared to Non-Hibernator Cells. *Int J Mol Sci*, **21**(5). https://doi.org/10.3390/ijms21051864

Hendriks, K. D. W., Lupi, E., Hardenberg, M. C., Hoogstra-Berends, F., Deelman, L. E., & Henning, R. H. (2017). Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep*, **7**(1), 15482. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15606-z

Hoffstaetter, L. J., Mastrotto, M., Merriman, D. K., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2018). Somatosensory Neurons Enter a State of Altered Excitability during Hibernation. *Curr Biol*, **28**(18), 2998–3004 e2993. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.020

Horowitz, J. M., & Horwitz, B. A. (2019). Extreme Neuroplasticity of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in Hibernating Mammalian Species. *Front Neuroanat*, **13**, 9. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00009

Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Roveri, A., Peng, X., Porto Freitas, F., Seibt, T., Mehr, L., Aichler, M., Walch, A., Lamp, D., Jastroch, M., Miyamoto, S., Wurst, W., Ursini, F., Arner, E. S. J., . . . Conrad, M. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, **172**(3), 409–422 e421. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.048

Jensen, B. S., & Fago, A. (2021). Sulfide metabolism and the mechanism of torpor. *J Exp Biol*, **224**(17). https://doi.org/10.1242/jeb.215764

Jensen, B. S., Pardue, S., Duffy, B., Kevil, C. G., Staples, J. F., & Fago, A. (2021). Suppression of mitochondrial respiration by hydrogen sulfide in hibernating 13-lined ground squirrels. *Free Radic Biol Med*, **169**, 181–186. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.009

Kokoz Yu, M., Grichenko, A. S., Korystova, A. F., Lankina, D. A., Pimenov, O., & Markevich, N. I. (2000). The regulation of L-type Ca2 + currents in cardiac myocytes of hibernating animals. *Membr Cell Biol*, **14**(2), 277–284. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093588

Kondo, N. (1986). Excitation-contraction coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks: effects of isoprenaline, a high calcium medium, and ryanodine. *Circ Res*, **59**(2), 221–228. https://doi.org/10.1161/01.res.59.2.221

Kraft, V. A. N., Bezjian, C. T., Pfeiffer, S., Ringelstetter, L., Muller, C., Zandkarimi, F., Merl-Pham, J., Bao, X., Anastasov, N., Kossl, J., Brandner, S., Daniels, J. D., Schmitt-Kopplin, P., Hauck, S. M., Stockwell, B. R., Hadian, K., & Schick, J. A. (2020). GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *ACS Cent Sci*, **6**(1), 41–53. https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01063

Krilowicz, B. L., Glotzbach, S. F., & Heller, H. C. (1988). Neuronal activity during sleep and complete bouts of hibernation. *Am J Physiol*, **255**(6 Pt 2), R1008–1019. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.255.6.R1008

Laursen, W. J., Mastrotto, M., Pesta, D., Funk, O. H., Goodman, J. B., Merriman, D. K., Ingolia, N., Shulman, G. I., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2015). Neuronal UCP1 expression suggests a mechanism for local thermogenesis during hibernation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**(5), 1607–1612. https://doi.org/10.1073/pnas.1421419112

Lillo-Moya, J., Rojas-Sole, C., Munoz-Salamanca, D., Panieri, E., Saso, L., & Rodrigo, R. (2021). Targeting Ferroptosis against Ischemia/Reperfusion Cardiac Injury. *Antioxidants (Basel)*, **10**(5). https://doi.org/10.3390/antiox10050667

Mao, C., Liu, X., Zhang, Y., Lei, G., Yan, Y., Lee, H., Koppula, P., Wu, S., Zhuang, L., Fang, B., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2021). DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, **593**(7860), 586–590. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03539-7

Mathers, K. E., McFarlane, S. V., Zhao, L., & Staples, J. F. (2017). Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *J Comp Physiol B*, **187**(1), 227–234. https://doi.org/10.1007/s00360-016-1022-0

Mathers, K. E., & Staples, J. F. (2019). Differential posttransla-

tional modification of mitochondrial enzymes corresponds with metabolic suppression during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **317**(2), R262-R269. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00052.2019

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

Mishima, E., Ito, J., Wu, Z., Nakamura, T., Wahida, A., Doll, S., Tonnus, W., Nepachalovich, P., Eggenhofer, E., Aldrovandi, M., Henkelmann, B., Yamada, K. I., Wanninger, J., Zilka, O., Sato, E., Feederle, R., Hass, D., Maida, A., Mourao, A. S. D., . . . Conrad, M. (2022). A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature*, **608**(7924), 778–783. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05022-3

Nakamura, T., Ogawa, M., Kojima, K., Takayanagi, S., Ishihara, S., Hattori, K., Naguro, I., & Ichijo, H. (2021). The mitochondrial Ca(2 +) uptake regulator, MICU1, is involved in cold stress-induced ferroptosis. *EMBO Rep*, **22**(5), e51532. https://doi.org/10.15252/embr.202051532

Ohta, H., Okamoto, I., Hanaya, T., Arai, S., Ohta, T., & Fukuda, S. (2006). Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **143**(4), 484–491. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.002

Osborne, P. G., & Hashimoto, M. (2007). Brain ECF antioxidant interactions in hamsters during arousal from hibernation. *Behav Brain Res*, **178**(1), 115–122. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.12.006

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 e816. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.010

Peretti, D., Bastide, A., Radford, H., Verity, N., Molloy, C., Martin, M. G., Moreno, J. A., Steinert, J. R., Smith, T., Dinsdale, D., Willis, A. E., & Mallucci, G. R. (2015). RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature*, **518**(7538), 236–239. https://doi.org/10.1038/nature14142

Perez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1778**(7–8), 1676–1695. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.003

Rosenquist, T. H. (1970). Ultrastructural changes in the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum of myocardial cells during hibernation. *Cryobiology*, **7**(1), 14–18. https://doi.org/10.1016/0011-2240(70)90040-4

Ross, A. P., Christian, S. L., Zhao, H. W., & Drew, K. L. (2006). Persistent tolerance to oxygen and nutrient deprivation and N-methyl-D-aspartate in cultured hippocampal slices from hibernating Arctic ground squirrel. *J Cereb Blood Flow Metab*, **26**(9), 1148–1156. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600271

Savaskan, N. E., Ufer, C., Kuhn, H., & Borchert, A. (2007). Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem*, **388**(10), 1007–1017. https://doi.org/10.1515/BC.2007.126

Scheerer, P., Borchert, A., Krauss, N., Wessner, H., Gerth, C., Hohne, W., & Kuhn, H. (2007). Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*, **46**(31), 9041–9049. https://doi.org/10.1021/bi700840d

Sekizawa, S., Horowitz, J. M., Horwitz, B. A., & Chen, C. Y. (2012). Realignment of signal processing within a sensory brainstem nucleus as brain temperature declines in the Syrian hamster, a hibernating species. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **198**(4), 267–282. https://doi.org/10.1007/s00359-011-0706-x

Sekizawa, S., Horwitz, B. A., Horowitz, J. M., & Chen, C. Y. (2013). Protection of signal processing at low temperature in baroreceptive neurons in the nucleus tractus solitarius of Syrian hamsters, a hibernating species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **305**(10), R1153–1162. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00165.2013

Shah, R., Farmer, L. A., Zilka, O., Van Kessel, A. T. M., & Pratt, D. A. (2019). Beyond DPPH: Use of Fluorescence-Enabled Inhibited Autoxidation to Predict Oxidative Cell Death Rescue. *Cell Chem Biol*, **26**(11), 1594–1607 e1597. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.007

Shah, R., Shchepinov, M. S., & Pratt, D. A. (2018). Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Cent Sci*, **4**(3), 387–396. https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00589

Shintoku, R., Takigawa, Y., Yamada, K., Kubota, C., Yoshimoto, Y., Takeuchi, T., Koshiishi, I., & Torii, S. (2017). Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3. *Cancer Sci*, **108**(11), 2187–2194. https://doi.org/10.1111/cas.13380

Singhal, N. S., Bai, M., Lee, E. M., Luo, S., Cook, K. R., & Ma, D. K. (2020). Cytoprotection by a naturally occurring variant of ATP5G1 in Arctic ground squirrel neural progenitor cells. *Elife*, **9**. https://doi.org/10.7554/eLife.55578

Skepper, J. N., & Navaratnam, V. (1995). Ultrastructural features of left ventricular myocytes in active and torpid hamsters compared with rats: a morphometric study. *J Anat*, **186**(Pt 3)(Pt 3), 585–592. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559131

Sonntag, M., & Arendt, T. (2019). Neuronal Activity in the Hibernating Brain. *Front Neuroanat*, **13**, 71. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00071

Soula, M., Weber, R. A., Zilka, O., Alwaseem, H., La, K., Yen, F., Molina, H., Garcia-Bermudez, J., Pratt, D. A., & Birsoy, K. (2020). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers. *Nat Chem Biol*, **16** (12), 1351–1360. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0613-y

Staples, J. F. (2014). Metabolic suppression in mammalian hibernation: the role of mitochondria. *J Exp Biol*, **217**(Pt 12), 2032–2036. https://doi.org/10.1242/jeb.092973

Suri, L. N., McCaig, L., Picardi, M. V., Ospina, O. L., Veldhuizen, R. A., Staples, J. F., Possmayer, F., Yao, L. J., Perez-Gil, J., & Orgeig, S. (2012). Adaptation to low body temperature influences pulmonary surfactant composition thereby increasing fluidity while maintaining appropriately ordered membrane structure and surface activity. *Biochim Biophys Acta*, **1818** (7), 1581–1589. https: //doi. org/10.1016/j. bba mem.2012.02.021

Toien, O., Drew, K. L., Chao, M. L., & Rice, M. E. (2001). Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**(2), R572–583. https: //doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572

Wang, S. Q., Lakatta, E. G., Cheng, H., & Zhou, Z. Q. (2002). Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J Exp Biol*, **205**(Pt 19), 2957–2962. https://doi.org/10.1242/jeb.205.19.2957

Wenzel, S. E., Tyurina, Y. Y., Zhao, J., St Croix, C. M., Dar, H. H., Mao, G., Tyurin, V. A., Anthonymuthu, T. S., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I. H., Kenny, E. M., Yang, Q., Rosenbaum, J. C., Sparvero, L. J., Emlet, D. R., Wen, X., Minami, Y., . . . Kagan, V. E. (2017). PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell*, **171** (3), 628–641 e626. https: //doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.044

Wu, S., Mao, C., Kondiparthi, L., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2022). A ferroptosis defense mechanism mediated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **119** (26), e2121987119. https://doi.org/10.1073/pnas.2121987119

Yan, B., Ai, Y., Sun, Q., Ma, Y., Cao, Y., Wang, J., Zhang, Z., & Wang, X. (2021). Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol Cell*, **81**(2), 355–369 e310. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.024

Yan, H. F., Tuo, Q. Z., Yin, Q. Z., & Lei, P. (2020). The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zool Res*, **41**(3), 220–230. https: //doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, **156**(1–2), 317–331. https: //doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010

Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., Motta, L., Richardson, A., & Prolla, T. A. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, **34**(4), 496–502. https: //doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01360-6

Yatani, A., Kim, S. J., Kudej, R. K., Wang, Q., Depre, C., Irie, K., Kranias, E. G., Vatner, S. F., & Vatner, D. E. (2004). Insights into cardioprotection obtained from study of cellular Ca2 + handling in myocardium of true hibernating mammals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**(6), H2219–2228. https: //doi.org/10.1152/ajpheart.01096.2003

Zhao, H. W., Ross, A. P., Christian, S. L., Buchholz, J. N., & Drew, K. L. (2006). Decreased NR1 phosphorylation and decreased NMDAR function in hibernating Arctic ground squirrels. *J Neurosci Res*, **84** (2), 291–298. https: //doi.org/10.1002/jnr.20893

Zou, Y., Henry, W. S., Ricq, E. L., Graham, E. T., Phadnis, V. V., Maretich, P., Paradkar, S., Boehnke, N., Deik, A. A., Reinhardt, F., Eaton, J. K., Ferguson, B., Wang, W., Fairman, J., Keys, H. R., Dancik, V., Clish, C. B., Clemons, P. A., Hammond, P. T., . . . Schreiber, S. L. (2020). Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion. *Nature*, **585**(7826), 603–608. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2732-8

Zou, Y., Li, H., Graham, E. T., Deik, A. A., Eaton, J. K., Wang, W., Sandoval-Gomez, G., Clish, C. B., Doench, J. G., & Schreiber, S. L. (2020). Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol*, **16**(3), 302–309. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0472-6

低温科学 81 （2023） 173–180
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 173

クマ類の冬眠
―繁殖との関係―

坪田　敏男[1)]

2022 年 12 月 12 日受付，2023 年 1 月 11 日受理

クマ類の冬眠は，体温の降下度が小さい，中途覚醒がない，筋肉や骨の退行がない，インスリン抵抗性になる，などの特徴を有する．オスでは，冬眠中（2〜3 月）に精子形成が再開し，メスよりも早く冬眠から覚める．メスは，初夏の交尾後に着床遅延を維持するが，冬眠導入期（11 月下旬〜12 月上旬）に着床する．その後約 2ヶ月で胎子発育を完了し，冬眠中間期の 1 月下旬〜2 月上旬に出産する．さらに冬眠後半期に新生子を哺育するが，母グマのみ冬眠を継続する．ヒグマやツキノワグマと違ってホッキョクグマでは，メスだけが出産・哺育のために冬眠するが，雌雄共に夏〜秋にはほぼ飢餓状態になるため“歩く冬眠”と呼ばれる冬眠様生理状態に切り替える．

Hibernation in bears — Relations with reproduction

Toshio TSUBOTA[1]

Hibernation in bears is characterized by slight drop in body temperature, no periodic arousal, no muscle or bone regression, and insulin resistance. Males resume spermatogenesis during hibernation (February-March) and emerge from hibernation earlier than females. Females maintain delayed implantation after mating in early summer and implant embryos at the time of hibernation induction (late November-early December). Female bears then complete fetal development in about two months and give birth in the mid-hibernation period (late January to early February), followed by nurturing their neonates in the late hibernation period, when only the mother bear continues to hibernate but not neonates do. Unlike brown bears and black bears, only females of polar bears hibernate to give birth and nurture their young, but both male and female polar bears switch to a hibernation-like physiological state called “walking hibernation” from summer to autumn, when they get starvation.

キーワード：クマ，冬眠，精子形成，着床遅延，歩く冬眠
bear, hibernation, spermatogenesis, delayed implantation, walking hibernation

世界には 3 属 8 種のクマ類（ホッキョクグマ *Ursus maritimus*，ヒグマ *U. arctos*，ツキノワグマ *U. thibetanus*，アメリカクロクマ（以下，クロクマと略）*U. americanus*，アンデスグマ（メガネグマ）*Tremarctos ornatus*，ナマケグマ *U. ursunus*，マレーグマ *U. malayanus* およびジャイアントパンダ *Ailuropoda melanoleuca*）が現存するが，そのうち冬眠することが明らかなのは，北半球に生息するホッキョクグマ，ヒグマ，ツキノワグマおよびクロクマの 4 種である．本稿では，これら 4 種のクマ類，とくに日本に生息しているヒグマとツキノワグマについて（本文中とくにことわりがなければクマはヒグマ，ツキノワグマまたはクロクマのいずれかを指す），これまでにわかっている冬眠の生態や生理について繁殖との関係を中心に述べていく．

連絡先
坪田　敏男
北海道大学大学院獣医学研究院野生動物学教室
〒060–0818　札幌市北区北 18 条西 9 丁目
Tel. 011–706–5101
e-mail：tsubota@vetmed.hokudai.ac.jp

1）北海道大学大学院獣医学研究院野生動物学教室
Laboratory of Wildlife Biology and Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University
〒060–0818　札幌市北区北 18 条西 9 丁目
Kita 18 jo Nishi 9 chome, Sapporo, Hokkaido 060–0818

1．クマの冬眠の特徴

かつてクマの冬の眠りは冬眠ではなく冬ごもりと呼ばれていた．それは，体温をさほど下げずに，いつでも覚醒できるのでそのように呼ばれていた．しかし，その後，クマも他の冬眠性哺乳類（シマリス，ジリス，ハムスターなど）と同じように，冬になると体温や代謝を下げ，冬眠状態になることがわかった（図 1）（宮崎，下鶴の稿参照）．ただし，体温の降下度は小さく，およそ 4〜6℃しか低下しないのは他の冬眠性哺乳類とは異なる点である．逆に，それがクマの冬眠の特徴ともいえる．クマは体サイズが大きいので体積に対する体表面積の小ささや，厚い体脂肪による断熱効果が関係していると考えられる．さらには，いったん体温を大幅に低下させてしまうと，覚醒時に体全体を温めるコストが大きいことも関係しているのであろうが，詳細な理由は未だ明らかにされていない．これまでに，体温以外では心拍数（40〜50 回/分から 8–10 回/分に）や代謝率（100％から 20–50％に）が低下していることが報告されている（Folk et al., 1976; Stenvinkel et al., 2012）．さらに，糖代謝，脂肪代謝及び蛋白質代謝が，冬眠とともに大きく変化することもわかっている．

中でも，他の冬眠性哺乳類と最も大きく異なる点は，中途覚醒が見られないことである．すなわち，シマリスやハムスターでは冬眠が始まっても数日間の持続的冬眠の後に中途覚醒がみられるが，クマは数ヶ月間，持続的冬眠だけを継続し，中途覚醒は一切ない．すなわちクマは，数ヶ月間，摂食飲水および排泄排尿をしなくてもやっていける生理機構を有している（Nelson et al., 1973）．冬眠中に必要なエネルギーは，すべて冬眠前に体脂肪として蓄える．この体脂肪を利用することによって必要なエネルギーや栄養素，さらには水を得ている．冬眠中クマは，体脂肪（中性脂肪）から遊離脂肪酸を動員して脂肪酸分解により得られるエネルギーを使っている．さらに，アミノ酸やグリセロールからの糖新生により血糖値を安定的に維持している．また，脂肪酸分解により代謝水も得られるので，一切の飲水がなくても脱水することがない．また，冬眠前に摂食した消化物を“止め糞”として肛門（直腸）に詰め，冬眠中に排泄をしない（坪田，2000）．さらに，尿については未だすべて解明されていないが，膀胱には濃縮した尿が溜まっているが外に出すことはない．蛋白質代謝産物である尿素を再利用してアミノ酸構築しているとされる（Ahlquist et al., 1976）．蛋白質の利用が少ないので血中尿素（U）濃度は低下し，血中クレアチニン（C）濃度が上昇している．その結果

図 1：冬眠しているアメリカクロクマ（アメリカ合衆国ミネソタ州にて）

U/C 比が 10 以下にまで低下している（活動時は 25 以上）（Nelson et al., 1984）．

2 つ目のクマの冬眠の特徴としては，数ヶ月間狭い冬眠穴の中でほぼ不動化状態が続くにも拘らず筋肉や骨の衰えがないことである．筋肉については宮崎充功氏の別稿に委ねるが，冬眠中（130 日間の不動化状態）でも活動時の 77％もの筋力を維持している（人では同じ状態で 10％しか維持できない）のは驚きである（Harlow et al., 2001）．一方，骨については，冬眠中の不動化が骨粗鬆症のように多孔の増大，ミネラルの減少，物理的な脆弱化などを引き起こすことがない．数ヶ月間もの不動化状態が続いても毎年春になると冬眠から覚め，しばらくの訓練期間はあるものの速やかに活動を再開することから大きなダメージはないと言っていい．最近の報告によると，冬眠中のグリズリー／ヒグマは，骨形成も骨吸収も共に低いレベルで維持し，骨の代謝を低下させていることがわかっている（McGee et al., 2008）．一方，クロクマでは，冬眠中の骨の動作がない期間，骨吸収は進むが，冬眠覚醒時に速やかに骨形成が起こり，骨のカルシウム含量などが健康な状態に戻ると報告されている（Donahue et al., 2003）．冬眠中のツキノワグマ血清中に骨吸収を抑制する因子が含まれていることもわかっている（Nasoori et al., 2020）．

さらにもう一つクマの冬眠の特徴を上げるとしたら，インスリン抵抗性になっていることであろう．冬眠前の食欲亢進期には体脂肪を蓄積するためにインスリンに対する糖吸収反応が上昇しているが（体脂肪蓄積モード），いったん冬眠に入ると今度は体脂肪から中性脂肪を動員して脂肪酸分解によりエネルギーや栄養素を得ている（体脂肪消費モード）．実際冬眠中のクマでは，血中アミノ酸およびグルコース濃度（血糖値）は安定的に維持さ

れている．この時，インスリンに対して敏感に体が反応していては，これらのことがうまく働かなくなるため，インスリン抵抗性となっているのであろう．実際，冬眠中に血中糖負荷試験を行うと血糖値は速やかに下がらず，血中インスリン濃度も高値を持続する（Kamine et al., 2012）．

日本のヒグマやツキノワグマは，毎年およそ 11 月下旬～12 月上旬に冬眠に入る．山の餌資源が減り，気温の低下や降雪など環境条件が整うとクマは冬眠に入る．そこには生物リズムも関係しているかもしれない（Thiel et al., 2022）．しばらくは冬眠穴内で冬眠に入らず起きているが，数日後には眠りにつく（坪田，1982）．数ヶ月の後，3 月中旬～5 月上旬に冬眠から覚めるが，その順番としてオス，単独メス，そして子連れメスと決まっている（Yamamoto et al., 2016）．オスの覚醒は生殖機能の活動と関係しており，第 3 項で解説する．妊娠メスは冬眠中に出産と哺育をするので（第 5 項参照），覚醒が遅れる．Evans et al.（2016）によると，ヒグマの冬眠への導入には環境要因が強く効いているのに対して，冬眠の終了には生理的要因が強く効いているとされている．

2．冬眠前に食欲亢進により体脂肪を蓄える

野外では，およそ 10～11 月にドングリ（ミズナラやコナラの種子）をはじめとする堅果類，さらにはヤマブドウやサルナシ（コクワ）などの液果類が実る季節を迎える（坪田・山﨑，2011）．これらは，クマにとって栄養価の高い重要な餌資源である．さらに，一部の地域（北海道東部など）ではマスやサケが遡上するので蛋白源として利用されることになる（Shirane et al., 2021; Jimbo et al., 2022）．これらの高栄養価の餌を食することで，夏の時期まで落ち続けた体重および栄養状態の回復を図ることになる．いわゆる食欲亢進（hyperphagia）により摂食量が増大し，体の維持や活動に必要なエネルギーを除き余剰分は体脂肪として蓄えられる．この時，体重にしておよそ 30～40％増大するとされている（坪田・山﨑，2011）．また，野生下ほど餌の量が変化しない飼育条件下でも体重が増加することがわかっており（Hashimoto et al., 1999），単に食物量が増えるだけではなく生体内の消化吸収や代謝メカニズムも変化している．とくに糖の吸収速度やインスリンの反応速度が，この時期早まっていることがわかっている（Kamine et al., 2012）．実際，体脂肪計を使って体脂肪量を測定してみると，この時期の増体量はほとんどが体脂肪によるものである（Nakamura et al., 2008）．クロクマの摂取カロリーは，

図 2：冬眠前食欲亢進期の超肥満状態にあるヒグマ（北海道知床半島にて）

夏の平常時では 8,000 kcal/日だったのが食欲亢進期には 15,000～20,000 kcal/日まで増大している（Stenvinkel et al., 2012）．11 月下旬になると，十分に飽食したクマは超肥満状態となり，冬眠の準備が完了する（図 2）．

しかしながら，上に書いたようなシナリオが毎年同じように営まれるわけではない．というのは，堅果類や液果類，さらにはサケの遡上量には年による較差があるからである．とくに堅果類の豊凶はクマにとって深刻な問題であり，凶作年には餌を求めて人里に出没するクマの数が急増する（いわゆる大量出没）．結果，人身事故が多発することになり，問題グマは駆除されるので捕殺数が顕著に増大する．このように食欲亢進期の餌資源がクマの行動を大きく左右するのは間違いないことである（坪田・山﨑，2011）．

クマでは，冬眠前に体脂肪を蓄え始めると，脂肪細胞から分泌されるレプチンの血中濃度が上昇し始める．体脂肪量がピークとなる 11 月下旬～12 月上旬に血中レプチン濃度もピークとなり，その後急激に下降する．このような変化を見せるレプチンの生理作用については未だ解明されていないが，体脂肪量（栄養状態）の変化を生殖系システムに伝達する役割があるのかもしれない（Tsubota et al., 2008）．すなわち，十分な体脂肪量を蓄えたことが着床遅延中の胚の再活性化と着床の成立につながり，その後の妊娠から出産までのプロセスがうまく進むと考えられる．

3．オスは冬眠中に精子形成を再開する

オスグマの繁殖サイクルとしては，毎年交尾期の前後に生殖能力を活性化させ，それ以外の期間は生殖能力が

低下する．それを精巣内の精子形成像で観察するとよくわかる．交尾期には精細管内の精細胞数が増え，精子までの分裂が盛んに行われている．すなわち，精祖細胞，一次精母細胞，二次精母細胞（精娘細胞），精子細胞および精子が観察される（Tsubota et al., 1989）．セルトリ細胞も精子形成とともに機能が活性化する．とくに興味深いのは，冬眠中の 2〜3 月に既に精子形成の再開がみられることである．すなわち，精細管にセルトリ細胞（支持細胞）と精祖細胞しか見られなかったのが，2〜3 月になると精祖細胞から細胞分裂（減数分裂）により精母細胞，精娘細胞および精子細胞が存在するようになる（Komatsu et al., 1997）．この時の精子形成の再開を調節しているのが性ホルモンである．とくに精子形成を促進する働きのある卵胞刺激ホルモン（FSH）とテストステロンが実際この時期に増加し始めることがわかっている（Iibuchi et al., 2010a）．このように冬眠中のクマは，他の代謝機能を低下させている中で精巣は機能を再開させている．その後精子形成が最も活性化する交尾期に血中テストステロン濃度も最高値を示す．さらに，テストステロン合成に必要なステロイド代謝酵素，P450scc, p450c17 および 3βHSD の局在について，ヒグマとツキノワグマで調べられた．免疫組織化学的手法により，これらの酵素発現が 2〜3 月から交尾期までライディッヒ細胞（間質細胞）に認められる（Tsubota et al., 1997）．また，*in situ* hybridization 法により，ステロイド代謝酵素の mRNA 発現レベルが交尾期に増大していることがわかっている（Iibuchi et al., 2010b）．一方，近年オスの生殖能力の指標としてエストロジェンも重要と考えられるようになり，実際クロクマにおいてエストロジェン合成に必要な P450arom の発現がセルトリ細胞および精細胞に局在し，とくに冬眠中の 2 月にはセルトリ細胞で発現が見られ始め，血中エストラジオール濃度も上昇し始める（Tsubota et al., 1997）．このように，冬眠中の精子形成の再開にエストロジェンも関与していると考えられる．冬眠覚醒後 1〜2ヶ月後に訪れる交尾期に向けてオスはいち早く生殖能力を高め，メスの発情の到来を待ち続けるのである．

4．メスは冬眠導入期に着床する

クマの交尾期は概ね 5〜7 月の初夏にみられる．ふだん単独生活しているクマが，交尾期に限りつがいを作り 1〜2 週間行動を共にしながら交尾する（Craighead et al., 1969; Ludlow, 1976）．ジャイアントパンダ（自然排卵する）を除くクマ類の排卵様式は交尾排卵と考えられており（Boone et al., 2004），排卵のためには複数回の交尾刺激（オスの臭いへの暴露を含む）が必要である．その時に受精が成立し妊娠を開始すると，他の哺乳類と同様に胚盤胞まで胚の分化が進むが，その段階で発達がほぼ止まる．すなわち，着床が誘導されずに未着床胚が子宮腔内に浮遊した状態で維持される（図 3）（Tsubota and Kanagawa, 1993）．これを着床遅延あるいは胚の発育停止と呼んでいる．日本のツキノワグマおよびヒグマであれば，およそ 11 月下旬〜12 月上旬のちょうど冬眠に入るタイミングに合わせて着床が起きるので，着床遅延期間は 4〜5ヶ月ということになる（Tsubota et al., 1987）．着床遅延期間中，排卵後に形成された黄体からのプロジェステロンの分泌は続けられるが，血中濃度は 1〜5 ng/ml と低いレベルで維持されている（Sato et al., 2001）．この時，黄体細胞でプロジェステロン合成が行われていることが確認されている（Tsubota et al., 2001）．着床遅延期間中，胚は発育をほぼ停止するが，細胞の数は増え胚の大きさ（直径）もおよそ 3 mm にまで大きくなっている（Tsubota et al., 1991）．着床のタイミングに合わせて血中プロジェステロン濃度は顕著に上昇する（Sato et al., 2001）．着床から約 2ヶ月間で胎子の発育を完成させる．スカンジナビアのヒグマでは胎子発育期間が 56 日という報告がある（Friebe et al., 2014）．ヒグマの胎子は，S 字状曲線を描くようにして発育することがわかっている（Tsubota et al., 1987）．では，着床を誘発する因子は何であろうか．クマでは直接的な証明はされていないが，他の哺乳類（ミンクやスカンク）ではプロラクチンを着床遅延期間に人為的に投与すると着床が誘発されたことが報告されている（Mead, 1993）．クマでも着床前時期にプロラクチン濃度が上昇しており，プロ

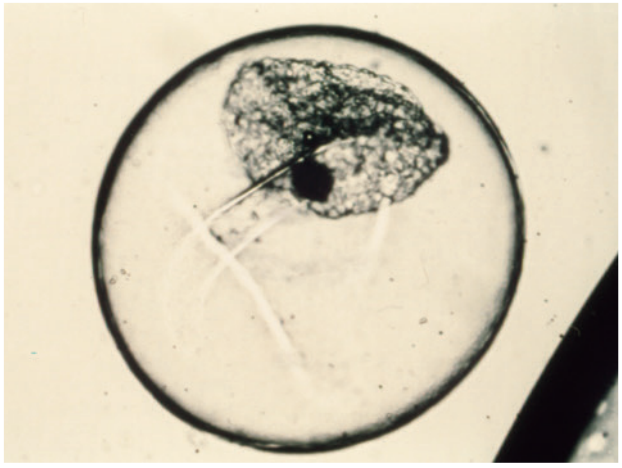


図 3：着床遅延中のツキノワグマ未着床胚（胚盤胞の段階で子宮腔に浮いた状態で生存を続ける）

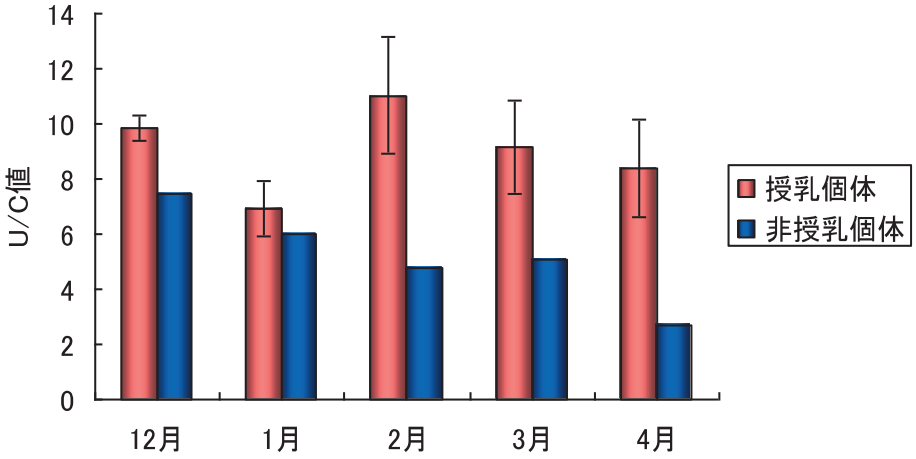


図 4：飼育下ツキノワグマにおける授乳メス個体と非授乳メス個体の血中尿素／クレアチニン濃度比（U/C 比）の比較

ラクチンが着床を誘発する因子と考えられている（Sato et al., 2001）．なお，ヒグマでは冬眠中であっても妊娠中に活動量（体勢を変える程度）が上昇することが報告されている（Fribe et al., 2013）．では，クマはなぜ着床遅延という特殊な生理機構を進化させたのであろうか．おそらく胎子発育期間が固定される中，交尾期と出産期を最適な時期にもってくるための調節期間として発達したのであろう．クマでいえば交尾期は初夏，出産期は真冬，さらに胎子発育期間が約 2ヶ月という制約を，着床遅延を行うことによりうまく調節できたのであろう（坪田，2020）．その結果，冬眠導入期と着床時期がほぼ一致することで，冬眠前の体脂肪蓄積により着床の成否が決まることになった．実際ヒグマでは，体脂肪率 20%以下だと繁殖に失敗する（子を連れない）ことがわかっている（Robbins et al., 2012）．

5．メスは冬眠の中間期に出産する

クマは，冬眠の中間期，およそ 1 月下旬～2 月上旬に出産する．交尾期が 5～7 月のおよそ 3ヶ月と長期間にわたるのに対して，出産期はおよそ 2 週間と限定される．かつて，のぼりべつクマ牧場（北海道登別市）のヒグマの出産日を調べたところ，1 月 17 日～2 月 5 日の 20 日間に 91%のメスが出産していた（Tsubota et al., 1994）．一方，野生下ではスウェーデンのヒグマの平均出産日は 1 月 26 日であったが，43 日ものレンジがあったと報告されている（Friebe et al., 2014）．また，クロクマでは，12 月下旬から 2 月中旬までの 53 日間にみられた（Bridges et al., 2011）．餌環境が変わらない飼育下では，妊娠の成立は個体によって時期に差（2ヶ月以上）があるものの，着床のタイミングがほぼ同じなので胎子発育開始がリセットされるのであろう．ただし，妊娠メスの栄養状態（体脂肪の蓄積程度）によって多少着床時期がずれるようである（Robbins et al., 2012）．着床（プロラクチン分泌の増大）のタイミングが何によって規定されるのか未解明であるが，冬眠への導入と同様，環境要因（日長や気温）または概年リズム（内的要因）によって個体共通の要因が働いている可能性が高い．前述したように，レプチンによる栄養状態のシグナル伝達も関係しているかもしれない．クマは 1 回に 2 頭の子を産むのが一般的で，一腹産子数は平均 1.80 または 1.76（レンジ 1～3）といった報告がある（Mano and Tsubota, 2002; Shimozuru et al., 2017）．飼育下ツキノワグマでは，哺育中の母グマは単独グマに比べて 34%も多くエネルギーを消費するが，子が 1 頭と 2 頭の場合でとくに差はない（Iibuchi et al., 2009）．環境中の餌資源量が一腹産子数を決める要因の一つになっている．時に父親が異なる異父同腹子も確認されている（Shimozuru et al., 2019）．出産前すなわち胎子発育期間には黄体からのプロジェステロン分泌により高体温（37～38℃）を維持していたのが，出産すると血中プロジェステロン濃度が基底値まで低下し，それに伴って体温も通常の冬眠時の体温（35℃以下）まで下がる（Shimozuru et al., 2013）．

出産後は，基本的には，母グマは冬眠を続けながら哺育を行う．すなわち新生子は覚醒していて乳を吸っている．実際哺育中のメスの活動量は増大しており，体温も少し高めである．また，血中 U/C 比は，活動期のそれよりは低いが，非妊娠メスよりやや高値を示す（図 4）．クマの乳成分は高脂肪高蛋白で，糖分は少ないことがわかっている（Iibuchi et al., 2009）．ただし，クマ特有のオリゴ糖が見つかっており（Urashima et al., 1997, 1999），これら脂肪とオリゴ糖を使って約 3ヶ月間冬眠穴の中で

子育てをする．4月下旬～5月上旬には，約10倍に体重を増やした子グマは母グマについて歩けるまで成長を遂げている．飼育下（のぼりべつクマ牧場）のヒグマでは，1日あたりの増体量は個体差が顕著で0.018～0.130 kg/日の範囲にあった（Tsubota et al., 1994）．また，ツキノワグマでは一腹産子数が1の時の方が2の場合より1日あたりの増体量が大きく，およそ1.65倍の差があった（Iibuchi et al., 2009）．

冬眠の覚醒を決める要因として気温や残雪量（融解程度）などの環境要因と生物リズムや体脂肪量などの内的要因が関係しているとされるが，内的要因の方が強く作用しているとされる（Evans et al., 2016）．

6．ホッキョクグマは冬眠するのか？

ホッキョクグマは，今から13万年ほど前，クマ類の中では最後にヒグマから分枝したとされる（Derocher, 2012；坪田・山中，2014）．しかしながら，ヒグマとホッキョクグマとでは食性に大きな違いがある．ヒグマがほぼ草食性（春～夏の草本，秋の堅果・液果など）なのに対して，ホッキョクグマはほぼ肉食性である（坪田・山﨑，2011）．ホッキョクグマは，冬から春にかけてアザラシ（主にワモンアザラシとアゴヒゲアザラシ）を捕食する（図5）．海氷をプラットホームとして利用し，呼吸のために浮上してくるアザラシを数時間待ち伏せる．また，氷上の巣穴に隠れているアザラシの幼獣を狩ることもある．捕らえたアザラシを食べるが，肉よりも脂肪を好んで食することがわかっている．したがって，ヒグマと違って冬に餌環境が豊富なので冬眠する必要がない．実際ホッキョクグマは冬～春の時期，5日に1頭の割合でアザラシを捕食することがわかっている（Derocher, 2012）．この間に，その後訪れる飢餓期間に備えて大量の体脂肪を身につける．すなわち，夏場にはアザラシ狩りができないこともあって餌が不足することになる．海鳥や海鳥の卵，さらに海藻や花などの植物まで食して飢えを凌ぐのである．この時，採食等の活動を続けながら体の機能を変えている．すなわち，冬眠時のように代謝を低下させてエネルギー消費を節約するのである．この時，実際，血中U/C比を測定すると，ヒグマの冬眠時のように，その値が10近くまで低下していることがわかっている（Derocher et al., 1990）．これを“歩く冬眠（walking hibernation）”と呼び，餌の不足に合わせて可塑的に代謝機能を調節できる仕組みを有している．このようにホッキョクグマは最も洗練された生理を獲得したといえる．

図5：地球温暖化の影響を受けているホッキョクグマ（Dr. Andrew Derocher写真提供）

メスのホッキョクグマが妊娠した場合，他のホッキョクグマとは異なるライフサイクルとなる．すなわち，秋になると氷下の土に穴を掘るか，雪穴を掘るかして，出産のために穴の中で過ごす．ホッキョクグマは，11～1月の間に出産し，ヒグマと同じように引き続き穴の中で哺育をする．この時母グマはヒグマと同じように体温や代謝を下げて冬眠していることがわかっている．その時の体温は，ヒグマと同じように活動時の体温から少しだけ低下させている．母グマは眠りながら子育てを続け，3～4月に穴から出てきて野外での活動を再開する．したがって妊娠メスは通常の夏～秋の飢餓期間（4ヶ月）から続けて冬眠期間（4ヶ月）として絶食をするので，約8ヶ月間ほとんど餌を食べないで出産と哺育を行うことになる．ヒグマやツキノワグマよりさらに厳しい過酷な環境の中で子を育てるのである．このように餌資源の多寡に合わせて柔軟に生理機構を調節したり，8ヶ月もの長期間にわたってほぼ絶食状態を継続したりするホッキョクグマは環境の変化に敏感な動物ともいえる．近年の地球温暖化による海氷の融解は，ホッキョクグマが適応できる以上のスピードで進んでおり，この種の将来は決して明るいものではない．

引用文献

Ahlquist, D., Nelson, R. A, Jones, J. D., and Ellefson, R. D. (1976) Glycerol and alanine metabolism in the hibernating black bear. Physiologist, **19**, 107.

Boone, W. R., Keck, B. B., Catlin, J. C., Casey, K. J., Boone, E. T., Dye, P. S., Schuett, R. J., Tsubota, T., and Bahr, J. M. (2004) Evidence that bears are induced ovulators. Theriogenology, **61**, 1163–1169.

Bridges, A. S., Vaughan, M. R., and Fox, J. A. (2011) American black bear estrus and parturition in the Alleghany mountains of Virginia. Ursus, **22**, 1–8.

Craighead, J. J., Hornocker, M. G., and Craighead, F. C. (1969) Reproductive biology of young female grizzly bears. J. Reprod. Fertil. Suppl., **6**, 447–475.

Derocher, A. E. (2012) Polar Bears -A Complete Guide to Their Biology and Behavior. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Derocher, A. E., Nelson, R. A., Stirling, I., and Ramsay, M. A. (1990) Effects of feeding on serum urea and serum creatinine levels in polar bears. Marine Mammal Sci., **6**, 196–203.

Donahue, S. W., Vaughan, M. R., Demers, L. M., and Donahue, H. J. (2003) Serum markers of bone metabolism show bone loss in hibernating black bears. Clinical Orthipaedics and Related Research, **408**, 295–301.

Evans, A. L., Singh, N. J., Friebe, A., Arnemo, J. M., Laske, T. G., Frobert, O., Swenson, J. E., and Blanc, S. (2016) Drivers of hibernation in the brown bear. Front. Zool., **13**, 7.

Friebe, A., Evans, A. L., Arnemo, J. M., Blanc, S., Brunberg, S., Fleissner, G., Swenson, J. E., and Zedrosser, A. (2014) Factors affecting date of implantation, parturition, and den entry estimated from activity and body temperature in free-ranging brown bears. PLoS ONE, **9**, e101410.

Friebe, A., Zedrosser, A., and Swenson, J. E. (2013) Detection of pregnancy in a hibernator based on activity data. Eur. J. Wildl. Res., **59**, 731–741.

Folk, G. E., Jr., Larson, A., and Folk, M. A. (1976) Physiology of hibernating bears. Int. Conf. Bear Res. and Manage., **3**, 373–380.

Harlow, H. J., Lohuis, T., Beck, T. D. I., and Iaizzo, P. A. (2001) Muscle strength in overwintering bears. Nature 409: 997.

Hashimoto, Y., and Yasutake, A. (1999) Seasonal changes in body weight of female Asiatic black bears under captivity. Mammal Study, **24**, 1–6.

Iibuchi, R., Kamine, A., Shimozuru, M., Nio-Kobayashi, J., Watanabe, G., Taya, K., and Tsubota T. (2010a) Changes in plasma gonadotropins, inhibin and testosterone concentrations and testicular gonadotropin receptor mRNA expression during testicular active, regressive and recrudescent phase in the captive Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Vet. Res., **57**, 185–196.

Iibuchi, R., Nakano, N., Nakamura, T., Urashima, T., Shimozuru, M., Murase, T., and Tsubota, T. (2009) Change in body weight of mothers and neonates and in milk composition during denning period in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Vet. Res., **57**, 13–22.

Iibuchi, R., Shimozuru, M., Kamine, A., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., and Tsubota, T. (2010b) Localization of five steroidogenic enzyme mRNAs in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*) testes during the mating season by in situ hybridization. J. Reprod. Dev., **56**, 236–242.

Jimbo, M., Ishinazaka, T., Shirane, Y., Umemura, Y., Yamanaka, M., Uno, H., Sashika, M., Tsubota, T., and Shimozuru, M. (2022) Natal habitat influence on lifelong foraging strategies in solitary large mammals. Ecosphere, **13**, e4105.

Kamine, A., Shimozuru, M., Shibata, H., and Tsubota, T. (2012) Changes in blood glucose and insulin responses to intravenous glucose tolerance tests and blood biochemical values in adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Vet. Res. **60**, 5–13.

Komatsu, T., Tsubota, T., Yamamoto, Y., Atoji, Y. and Suzuki, Y. (1997) Seasonal changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testes of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). J. Vet. Med. Sci., **59**, 521–529.

Ludlow, J. C. (1976) Observations on the breeding of captive black bears, Ursus americanus. Int. Conf. Bear Res. and Manage., **3**, 65–69.

Mano, T., and Tsubota, T. (2002) Reproductive characteristics of brown bears on the Oshima Peninsula, Hokkaido, Japan. J. Mammal., **83**, 1026–1034.

McGee, M. E., Maki, A. J., Johnson, S. E., Nelson, O. L., Robbins, C. T., and Donahue, S. W. (2008) Decreased bone turnover with balanced resorption and formation prevent cortical bone loss during disuse (hibernation) in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). Bone, **42**, 396–404.

Mead, R. A. (1993) Emryonic diapause in vertebrates. J. Exp. Zool., **266**, 629–641.

Nakamura, S., Okano, T., Yoshida, Y., Matsumoto, A., Murase, Y., Kato, H., Komatsu, T., Asano, M., Suzuki, M., Sugiyama, M., and Tsubota, T. (2008) Use of bioelectrical impedance analysis to measure the fat mass of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn. J. Zoo Wildl. Med., **13**, 15–20.

Nasoori, A., Okamatsu-Ogura, Y., Shimozuru, M., Sashika, M., and Tsubota, T. (2020) Hibernating bear serum hinders osteoclastogenesis *in-vitro*. PLoS ONE, **15(8)**, e0238132.

Nelson, R. A., Wahner, H. W., Jones, J. D., Ellefson, R. D., and Zollman, P. E. (1973) Metabolism of bears before, during and after winter sleep. Am. J. Physiol., **224**, 491–496.

Nelson, R. A., Beck, T. D. I., and Steiger, D. L. (1984) Ratio of serum urea to serum creatinine in wild black bears.

Science, **226**, 841–842.

Robbins, C., Ben-David, M., Fortin, J. K., and Nelson, O. L. (2012) Maternal condition determines birth date and growth of newborn bear cubs. J. Mammal. **93**, 540–546.

Sato, M., Tsubota, T., Komatsu, T., Watanabe, G., Taya, K., Murase, T., Kita, I., and Kudo, T. (2001) Changes in sex steroids, gonadotropins, prolactin and inhibin in pregnant and nonpregnant black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Biol. Reprod., **65**, 1006–1013.

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., and Tsubota, T. (2013) Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. J. Mammal. **94 (3)**, 618–627, 2013.

Shimozuru, M., Shirane, Y., Tsuruga, H., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Ishinazaka, T., Kasai, S., Nose, T., Masuda, Y., Fujimoto, Y., Mano, T., and Tsubota, T. (2019) Incidence of multiple paternity and inbreeding in high-density brown bear populations on Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. J. Heredity, **110(3)**, 321–331.

Shimozuru, M., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Moriwaki, J., Mori, F., Tsujino, M., Shirane, Y., Ishinazaka, T., Kasai, S., Nose, T., Masuda, Y., and Tsubota, T. (2017) Reproductive parameters and cub survival of brown bears in the Rusha area of the Shiretoko peninsuka, Hokkaido, Japan. PLoS ONE, **12(4)**, e0176251.

Shirane, Y., Jimbo, M., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Mori, F., Ishinazaka, T., Sashika, M., Tsubota, T., and Shimozuru, M. (2021) Dining from the coast to the summit: Salmon and pine nuts determine the summer body condition of female brown bears on the Shiretoko Peninsula. Ecol. Evol., **11**, 5204–5219.

Stenvinkel, P., Jani, A. H., and Johnson, R. J. (2012) Hibernating bears (Ursidae): metabolic magicians of definite interest for the nephrologist. Kidney International, **83**, 207–212.

Thiel, A., Giroud, S., Hertel, A. G., Friebe, A., Devineau, O., Fuchs, B., Blanc, S., Støen, O-G., Laske, T. G., Arnemo, J. M., and Evans, A. L. (2022) Seasonality in biological rhythms in Scandinavian brown bears. Front. Physiol., **13**, 785706.

坪田敏男（1982）冬眠―眠りと出産―．pp.98–108，北大ヒグマ研究グループ著 エゾヒグマ―その生活をさぐる―．汐文社，東京．

坪田敏男（2000）クマ―生理的側面から―．pp.213–233（冬眠する哺乳類；川道武男，近藤宣昭，森田哲夫 編），東京大学出版会，東京．

坪田敏男（2020）哺乳類の生物学③生理 新装版．高槻成紀，粕谷俊雄編．東京大学出版会，東京．

Tsubota, T., Howell-Skalla, L., Nitta, H., Osawa, Y., Mason, J. I., Miers, P. G., Nelson, R. A., and Bahr, J. M. (1997) Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. J. Reprod. Fertil., **109**, 21–27.

Tsubota, T., and Kanagawa, H. (1989) Annual changes in serum testosterone levels and spermatogenesis in the Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. J. Mammal. Soc. Jpn., **14**, 11–17.

Tsubota, T., and Kanagawa, H. (1993) Morphological characteristics of the ovary, uterus and embryo during the delayed implantation period in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). J. Reprod. Dev., **39**, 325–331.

Tsubota, T., Maeda, N., and Kanagawa, H. (1994) Parturition and postnatal development in the captive Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. J. Mammal. Soc. Jpn, **19**, 75–82.

Tsubota, T., Sato, M., Okano, T., Nakamura, S., Asano, M., Komatsu, T., Shibata, H., and Saito, M. (2008) Annual changes in serum leptin concentrations in the adult female Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). J. Vet. Med. Sci., **70**, 1399–1403.

Tsubota, T., Takahashi, Y., and Kanagawa, H. (1987) Changes in serum progesterone levels and growth of fetuses in Hokkaido brown bears. Int. Conf. Bear Res. and Manage., **7**, 355–358.

Tsubota, T., Takahashi, Y., Kanagawa, H., and Gohda, K. (1991) Embryo recovery during delayed implantation in the captive Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. J. Vet. Med. Sci. **53**, 141–142.

Tsubota, T., Taki, S., Nakayama, K., Mason, J. I., Kominami, S., Harada, N., and, Kita, I. (2001) Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and the placenta of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, during pregnancy. Reproduction, **121**, 587–594.

坪田敏男，山崎晃司（2011）日本のクマ―ヒグマとツキノワグマの生物学―．東京大学出版会，東京．

坪田敏男・山中淳史監訳（2014）ホッキョクグマ―生態と行動の完全ガイド（アンドリュー E. デロシェール著）．東京大学出版会，東京．

Urashima, T., Kusaka, Y., Nakamura, T., Saito, T., Maeda, N., and Messer, M. (1997) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. *Biochim. Biophy. Acta*, **1334**, 247–255.

Urashima, T., Sumiyoshi, W., Nakamura, T., Arai, I., Saito, T., Komatsu, T., and Tsubota, T. (1999) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*. Biochim. Biophy. *Acta*, **1472**, 290–306.

Yamamoto, T., Tamatani, H., Tanaka, J., Oshima, G., Mura, S., and Koyama, M. (2016) Abiotic and biotic factors affecting the denning behaviors in Asiatic black bears *Ursus thibetanus*. J. Mammal., **97**, 128–134.

低温科学 81 （2023） 181–189
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 181

クマの冬眠の生理・代謝機構
～如何に太り，如何に痩せるか～

下鶴　倫人[1)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 16 日受理

冬眠を行うクマ類は，秋期における飽食期において短期間に体脂肪を蓄積し，冬期は基礎代謝率を低下させることにより 3～7ヶ月にわたる冬眠期を乗り切る．飽食期においては，高栄養の食物を大量に食すだけでなく，肝臓や白色脂肪において効率良く脂肪合成を行うための代謝変化が生じる．一方冬眠に入ると，糖や筋蛋白の異化を抑制しつつ，脂肪を用いて効率良くエネルギー産生を行うよう代謝様式が切り替わる．クマが示す冬眠は，他の小型冬眠性哺乳類と比べ冬眠の形態に大きな違いが存在する．本稿では，飽食期と冬眠期における体温および代謝変化に関するこれまでの知見と，クマを対象とした冬眠研究の人の医療への応用性について概説する．

Physiological and Metabolic Mechanisms of Hibernating Bears
- How they gain and how they lose weight

Michito Shimozuru[1]

Bears experience seasonal changes in body mass: rapid increase during autumnal hyperphagia and decrease during winter hibernation. Here, I review the progress research on physiological and metabolic changes that occur in hyperphagia and hibernation period in bears.

キーワード：クマ，飽食期，冬眠，体温，代謝
Bear; Hyperphagia; Hibernation; Body temperature; Metabolism

1．はじめに

クマは冬眠を行う最大の哺乳類である．現存する 8 種のクマ科動物（Ursidae）のうち，ヒグマ（*Ursus arctos*），アメリカクロクマ（*Ursus americanus*），アジアクロクマ（*Ursus thibetanus*），および出産を控えたメスのホッキョクグマ（*Ursus maritimus*）が冬眠を行う．ただし，東南アジアなど亜熱帯地方に生息するアジアクロクマや，冬期に餌を与えられている飼育下のクマは冬眠を行わない．このようにクマ（本稿ではホッキョクグマを除く上記 3 種を指す言葉として用いる）の冬眠は，食物の有無や外気温などに影響を受ける点において，日和見的冬眠動物（facultative hibernator）と分類されることが多い（Gonzalez-Bernardo et al., 2020; Krofel et al., 2017）．しかしながら，夏期に冬眠を模した環境（絶食，低温，恒暗環境への暴露）におかれたクマは冬眠状態にならないなど（Nelson et al., 1983），内因性の概年リズム依存的に 1 年周期で行われる点において，義務的（あるいは季節強依存的）冬眠動物（obligate hibernator）と捉えることもできる（Chayama et al., 2016）．クマの冬眠は他の冬眠性哺乳類と同じく，代謝を下げることにより食物欠乏期である冬期を乗り切るために進化した適応的生物現象

連絡先
下鶴　倫人
北海道大学大学院獣医学研究院
〒060–0818　北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目
Tel. 011–706–7188
e-mail：shimozuru@vetmed.hokudai.ac.jp

1）北海道大学大学院獣医学研究院
〒060–0818　北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目
Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, 060–0818, Kita-18, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan

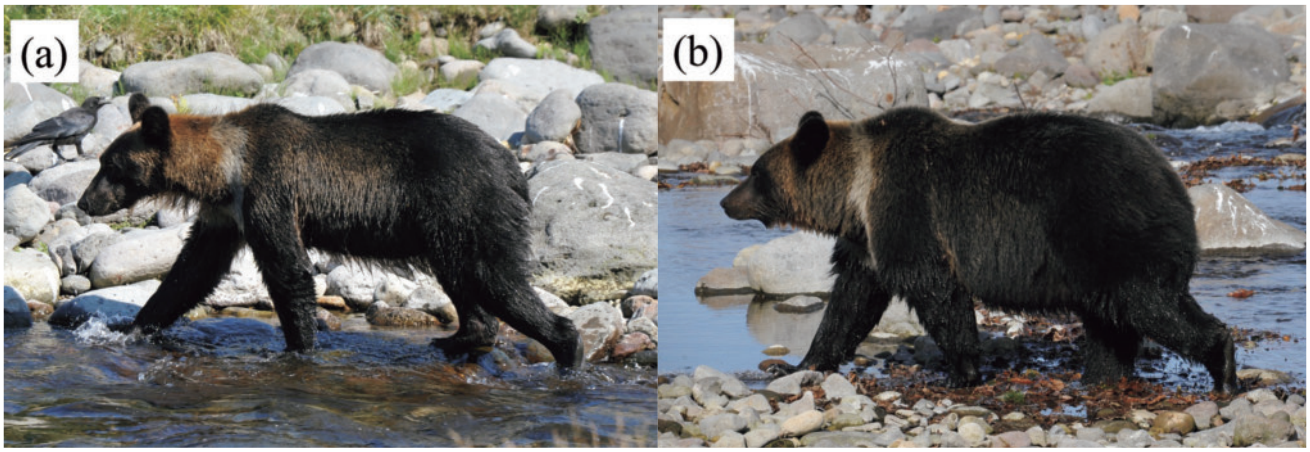


図 1：夏期から秋期にかけてのヒグマの体型変化．同一個体を 8 月 28 日（a）および 10 月 28 日（b）に撮影したもの．

であるが，1）体温の降下度が小さい（4〜7℃）こと（Hissa et al., 1994），2）深冬眠と中途覚醒により構成される「深冬眠―中途覚醒サイクル」を示さず，ほぼ間断なく眠り続けること（Tøien et al., 2011），3）完全に意識を失うことなく，外的刺激を受けるとすぐに反応し動くことができること（Hissa et al., 1994; Laske et al., 2011），4）妊娠したメスは冬眠中に出産し子育てを行うこと（Shimozuru et al., 2013）（坪田の稿参照）など，他の小型冬眠性哺乳類と比較して大きく異なる特徴を有している．クマは，「脂肪貯蔵型冬眠動物」に分類され，冬眠前に体内に蓄えた皮下脂肪を主なエネルギー源として，摂食・飲水，排泄・排尿を行わずに 3〜7ヶ月にわたる冬眠期を乗り切る（Hellgren, 1998; Nelson et al., 1983）．しかしながら，冬眠から覚めた後すぐに栄養状態が回復する訳ではない．むしろ春期から初夏にかけては高栄養の食物に乏しく，草本類やアリなどの昆虫類を利用しながら飢えを凌ぎ，再び高栄養の食物が利用できる秋の飽食期（hyperphagia stage）が来るまで痩せ続けるクマ個体群も存在する（Shirane et al., 2021）．さらに冬眠中に出産したメスグマにとっては，次の飽食期が来るまで子に栄養を与え続けられるか否かが，子の生死を分ける（Shimozuru et al., 2017）．このため，冬眠前の飽食期に如何に脂肪を蓄えることができるかは，冬眠中だけではなく，冬眠後の生存や繁殖の成否に大きな影響を及ぼす．本稿では，1 年の間に急激な体重の増減を経験するクマの生活環における「飽食期」と「冬眠期」に焦点を当て，それぞれの時期に生じる生理機構の変化についてこれまでの知見をもとに概説するとともに，クマの冬眠研究が有する人の医療への応用性について紹介する．

2. 飽食期における代謝変化

飽食期は，多くのクマ個体群において冬眠前の 9〜11 月頃までの期間を指し，栄養価の高い食物資源を大量に食し，短期間で体重を急激に増加させる．例えば知床半島に生息するヒグマ個体群では，8 月終わりからカラフトマス（*Oncorhynchus gorbuscha*）の遡上が始まると同時に体重が増加傾向に転じ，9 月終わり頃からはミズナラ（*Quercus crispula*）堅果などを利用することにより，極度の体重増加が見られる（図 1；Shirane et al., 2021）．飼育下のアメリカクロクマでは，通常活動期（5〜9 月）において 5,000〜8,000 kcal/日であった摂取カロリーが 15,000〜20,000 kcal/日まで増加することが報告されている（Nelson et al., 1983）．特にサケ科魚類を利用することができる生息地における体重増加は顕著で，アラスカのヒグマ個体群では 1 日の体重増加が 4 kg に達する（Hilderbrand et al., 1999）．こうした飽食期における体重増加は，体脂肪（特に皮下に蓄積される白色脂肪）の増加を反映しており（Nakamura et al., 2008），野生のクマの多くは秋の山の実りにより支えられている．例えば日本の本州に生息するツキノワグマ（*Ursus thibetanus japonicus*）では，ブナやミズナラ，クリの実など，炭水化物・脂質を豊富に含む堅果類が秋期の主要な食物資源となっており（Hashimoto, 2002），高栄養の食物が利用可能であることが，短期間で体脂肪を蓄積するための必須条件と言える．しかしながら一方で，冬眠前における体脂肪の増加は単なる過食のみに起因するのではなく，内因性の要因によっても制御されていることが示唆されている（Dark, 2005）．

体脂肪蓄積効率を高める 1 つの要因として，末梢組織におけるインスリン感受性の上昇が挙げられる．加味根ら（2012）は飼育下のツキノワグマを対象とし，通常活

動期である 8 月と飽食期のピークである 11 月上旬に，静注糖負荷試験を実施した．この結果，11 月上旬では 8 月に比べインスリンの基礎値や糖負荷後の分泌反応に差は認められなかったものの，血中のグルコース濃度の低下が早いことが明らかとなった．同様の変化は，ヒグマにおいても認められており（Rigano et al., 2017），クマは飽食期において末梢インスリン感受性を上昇させることにより，末梢組織における糖の取り込みを促進していると考えられる．また，インスリンの主要な標的器官であり，脂肪の合成と蓄積に重要な役割を担う肝臓や白色脂肪組織におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現の変化も報告されている．例えば，糖の取り込みに関与するグルコキナーゼや，脂肪合成に関わる脂肪酸合成酵素（*FAS*）やジアシルグリセロールトランスフェラーゼ 2（*DGAT2*）の肝臓における発現は，飽食期特異的に増加する（Shimozuru et al., 2012b）．白色脂肪組織においても同様に，*FAS* や *DGAT2* を含む脂肪合成に関与する酵素の遺伝子発現の増加が認められている（Shimozuru et al., 2016）．また，Perry ら（2022）は，インスリン感受性の低下に関わる SHC Adaptor Protein 1（*SHC1*）の遺伝子発現が飽食期特異的に低下することを報告している．いずれの報告においても，給餌量が一定に保たれた飼育環境で得られた結果であることから，上記の遺伝子発現変化は食物摂取量の増加を伴わなくても生じる内因性の変化であるといえる．このようにクマは秋期の飽食期に，末梢組織において高いインスリン感受性を維持しながら，肝臓や白色脂肪組織における糖や脂質の取り込みを促進し，脂肪合成の活性を高めることにより，効率良く体脂肪を蓄積する仕組みを有している．

特筆すべきは，クマは短期間に極度の肥満状態となるにも拘わらず，いたって健康であるという点である．例えば，空腹時における血中の中性脂肪の濃度は通常，体脂肪量を反映し肥満により上昇するが（Dark, 2005），クマでは飽食期に上昇するどころか，逆に低下する（Kamine et al., 2012; Shimozuru et al., 2012b）．また，体脂肪率が 40％を上回る飽食期のピークにおいても，肝臓における異所性の脂肪蓄積は認められず，いわゆる脂肪肝を呈することもない（加味根ほか, 2010）．このような飽食期における代謝機能の変化については，肝臓・脂肪組織・筋肉など末梢組織において網羅的手法を用いて遺伝子発現やアイソフォームの変化を調べた報告があるものの（Jansen et al., 2019; Perry et al., 2022; Rigano et al., 2017），冬眠中に生じる変化と比べると軽微であるために，十分な注目を得られていないと言わざるを得ない．クマがなぜ健康を保ちつつ肥満状態を促進することができるのか，その機序の解明が今後さらに進めば，人の肥満に関連した疾病の予防や治療法の開発など医学への応用が期待できるであろう．

3. 冬眠期における代謝変化

野生下のクマでは 10〜12 月頃になると地中に掘った穴や洞穴，樹洞などにおいて冬眠を開始し，基礎代謝率を通常活動期の 25〜50％程度まで減少させることにより（Tøien et al., 2011），最長で 7ヶ月にもわたる冬の食物欠乏期を乗り切る．冬眠期における体重減少は 20〜40％程度であり，年齢や性別，生息場所により差があることが知られている．例えば，スカンジナビア半島に生息するヒグマにおいてはオスで 26％，メスで 39％であり，冬眠中に出産・育子を行うメスにおいてより体重減少が顕著である（Swenson et al., 2007）．本章では，冬眠期に生じる生理・代謝機構の変化について既報の研究を基に概説する．

3.1. 心拍数および体温の変化

小型冬眠性哺乳類では，深冬眠―中途覚醒サイクルの発現と消失をもって，冬眠の開始と終了が明確に特定できるのに対し，クマでは冬眠期前後の心拍数・体温の下降・上昇は緩やかに生じるため，生理指標から冬眠の開始と終了を定義することは難しい．野生下のヒグマでは，活動量および心拍数の低下が，冬眠穴に入る 4 週ほど前から始まり，次に体温の低下が 2 週ほど遅れて（冬眠穴に入る 2 週ほど前から）開始されるが，冬眠穴に入り不活動状態となった後も心拍数・体温は緩やかに下降を続け，最も低値（心拍数：10 bpm 程度，体温：32℃程度）に達するまでそれぞれ 3 週および 4 週ほどを必要とする（Evans et al., 2016）．逆に冬眠から覚める際には，体温が心拍数の変化よりも先行する．体温の上昇は冬眠穴を離れる約 2ヶ月前から徐々に始まり，冬眠穴を出る頃にはほぼ活動時と同じ状態（37℃程度）にまで達する．これに対し心拍数の上昇は冬眠穴を離れる 1ヶ月ほど前から始まるものの，冬眠穴を出る時点においても通常活動期の半分以下であり，完全に元の状態（60〜80 bpm）に戻るにはさらに 2ヶ月を要する．このため，冬眠の終わりにおいては，体温とは無関係に低代謝状態が継続されることが知られている（Tøien et al., 2011）．冬眠中の体温変化の例として，飼育下におけるツキノワグマの皮下体温の推移を図 2 に示した．図に示すように，体温の降下は最大でも 2℃程度と軽微であり，他のクマ類における同様の研究においても，体温が 30℃を下回ることは

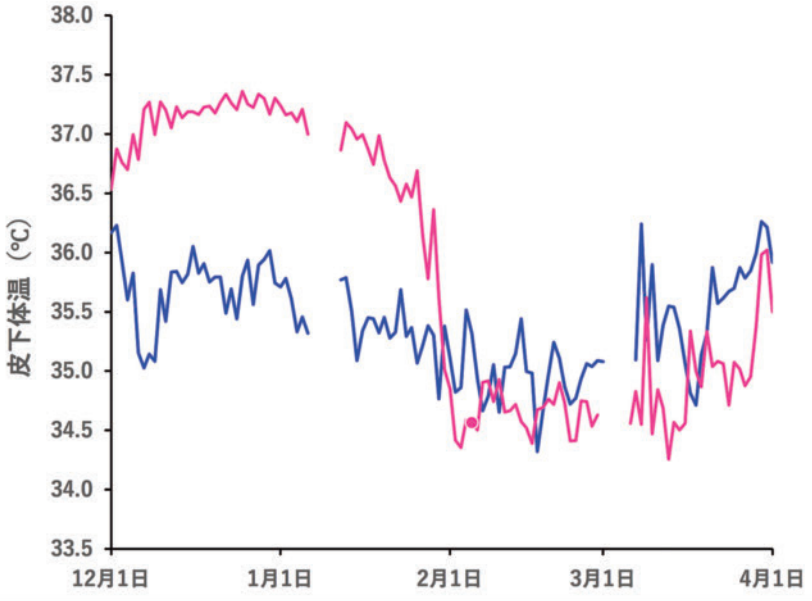


図 2：ツキノワグマにおける冬眠期の皮下体温の推移．非妊娠個体の 1 例を青で，妊娠個体の 1 例をピンクで示した．妊娠個体は 2 月 6 日（●で示す）に出産を行った．麻酔下での採材を行った後の 5 日間のデータは除外して表示した．（鈴木，下鶴ら，未発表）

ない（Tøien et al., 2015; Tøien et al., 2011）．クマは冬眠中に体温を 26℃ 程度まで人為的に低下させると心停止により死亡することから（Buresh et al., 2010），他の小型冬眠性哺乳類と異なり，組織・細胞レベルで低体温耐性を獲得していないことが体温の降下度が低い最大の要因であると考えられる．一方，妊娠しているメスグマでは，冬眠の開始とほぼ同時期に胚が着床し，分娩に至るまでの 2ヶ月間，38℃ 前後の高い体温が維持され，分娩を行う直前に体温が降下する（図 2；Shimozuru et al., 2013）．妊娠中は体温だけではなく血糖値も高く維持されており（Shimozuru et al., 2013），胎子の成長に適した体内環境の維持と，出産後の授乳のために，母グマはより大きな負担を強いられることになる（Harlow et al., 2002）．

クマにおける体温変化の特徴の一つとして，数日から数週間単位で体温の軽微な昇降（2〜6℃）が繰りかえされること（multi-day body temperature cycle; Tøien et al., 2015）が挙げられる（図 3）．この現象は，小型冬眠性哺乳類の示す深冬眠―中途覚醒サイクルとは性質を異にするものであり，体温上昇時に覚醒するなどの行動変化は伴わない．図 3 で示すように，体温が下限近く（34℃ 前後）に達すると一過性の体温の上昇が生じ，一定値（36℃ 前後）を上回ると体温が下降に転じる．つまり，下限に達すると産熱のスイッチが入り，上限に達するとオフになるような体温制御機構が働いていると推察される．しかしながら，小型冬眠性哺乳類の深冬眠時に見られるように，体温を一定に保ち続けるのではなく，なぜこのような調節を行うのかについては明らかではない．一見すると，よりエネルギーコストがかかる仕組みのように思われるが，冬眠中の生命活動を維持する上でなんらかの役割を担っている可能性も考えられる．

クマの冬眠中の体温調節機構について未だ結論を得ていない点として，非ふるえ産熱機構の存在の有無がある．体温と同時に筋電図をモニタリングした研究においては，体温の上昇期において筋肉のふるえ（Shivering）が生じていることから，主要な産熱機構はふるえ産熱であると考えられている（Tøien et al., 2015; Tøien et al., 2011）．このようなふるえは，ほぼ不動化状態である冬眠期において筋萎縮を防ぐことに貢献していると考える研究者もいる（Tøien et al., 2015）．一方，非ふるえ産熱機構の存在については，30 年ほど前に褐色脂肪の存在が報告されたものの（Davis et al., 1990），後にその存在を否定する報告が出されたきり（Jones et al., 1999），その存在を示唆する報告はない．しかしながら，他動物においては褐色脂肪細胞以外における非ふるえ産熱機構の存在が明らかになってきており（Bal et al., 2012）（鈴木らの稿参照），今後新たな産熱機構の存在が発見される可能性も残されている．

3.2. エネルギー代謝機構の変化

飼育下ツキノワグマにおける冬眠期における血中代謝

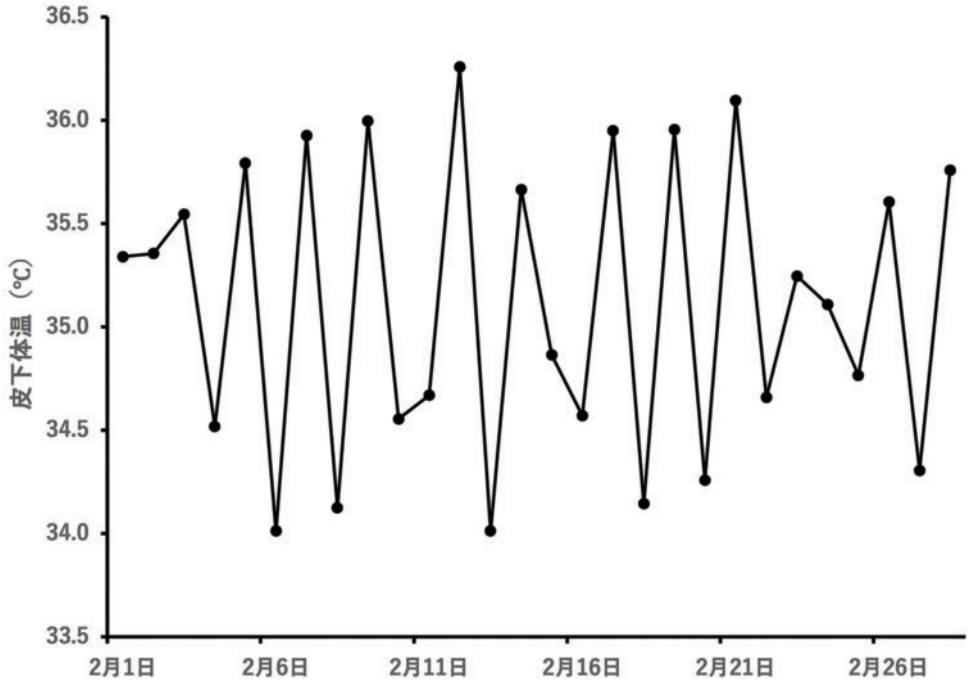


図 3：冬眠期に生じる体温の昇降サイクルの一例．メス 1 個体の 2 月中の皮下体温の推移を示した．（鈴木，下鶴ら，未発表）

関連成分の変化を表 1 に示した．冬眠中一切のエネルギー摂取を行わないにもかかわらず，血糖値は通常活動期と変わらず維持される．この仕組みの一つとして，末梢組織における糖の利用抑制がある．例として，白色脂肪や筋肉においてインスリン依存性の糖の取り込みに関与するグルコーストランスポーター 4 や，肝臓や白色脂肪組織における解糖系に関わるヘキソキナーゼの遺伝子発現が減少することが，ツキノワグマ（Shimozuru et al., 2012a; Shimozuru et al., 2016）およびヒグマ（Jansen et al., 2019）において報告されている．また一方で，肝臓における糖新生に関わるピルビン酸カルボキシラーゼなどの遺伝子発現の上昇も報告されており（Jansen et al., 2019; Shimozuru et al., 2012a），こうした機構により血糖値が一定に保たれているものと考えられる．糖新生の主な基質は，脂質の異化により生じるグリセロールであり，アラニンなど糖原生アミノ酸を用いた糖新生を抑制することで冬眠中の筋萎縮を防ぐことに貢献していると考えられている（Shimozuru et al., 2012a）．糖は主として脳におけるエネルギー源として利用されると考えられているものの（Rigano et al., 2017），直接的にそれを証明した研究は今の所ない．冬眠中のジリスの脳では，中途覚醒時のエネルギー源としてケトン体を選択的に利用しているという報告もある（Andrews et al., 2009）．冬眠中ヒグマの血中ケトン体は，通常活動期と比べ大幅に上昇するものの，人において重篤な代謝障害（ケトアシドーシス）を引き起こすレベル（＞ 3.0 mM；Laffel, 1999）に比べて軽度である（表 1）．このことからも，脳など他の組織がケトン体を代替エネルギーとして利用するよう代謝を変化させることで，糖の損失を防いでいる可能性が考えられる．

表 1：飼育下のツキノワグマにおける活動期（6〜7 月；20 頭）および冬眠期（2 月；25 頭）の血液生化学値（平均±標準誤差）．

	活動期	冬眠期
グルコース（mmol/L）	5.0±0.2	4.5±0.2
中性脂肪（mmol/L）	4.1±0.2	8.5±0.5
コレステロール（mmol/L）	7.7±0.2	9.4±0.3
遊離脂肪酸（mmol/L）	0.28±0.06	0.76±0.09
グリセロール（μmol/L）	76.0±11.2	146.6±16.0
総ケトン体（μmol/L）	37.6±6.9	664.3±79.6
尿素窒素（mmol/L）	3.1±0.2	1.7±0.2
クレアチニン（mmol/L）	0.14±0.01	0.21±0.01
総タンパク（g/L）	67.0±1.5	79.6±1.2

全ての測定項目において活動期と冬眠期との間に有意差（$P<0.001$）が認められた．

冬眠期における主要なエネルギー源は，皮下に蓄積した体脂肪を分解して得られる脂肪酸である．このことは，通常活動期において 0.78 程度であった呼吸商が，冬眠期に 0.69〜0.73（Ahlquist et al., 1984; Fedorov et al., 2009）と脂質のみを利用した際の理論値である 0.71 と

ほぼ同じ値を示すことからも明らかである．飽食期において肝臓や脂肪で発現の増加が見られた *FAS* や *DGAT2* といった脂肪合成酵素の発現は冬眠期に入ると減少に転じ，代わりにミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化を促進するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子発現が白色脂肪や筋肉で増加する（Jansen et al., 2019; Shimozuru et al., 2016）．このように飽食期から冬眠開始までのわずかな期間の間に，脂質同化モードから異化モードへと代謝機構のリモデリングが生じる．また，脂肪を分解した際に生じる代謝水は，冬眠中に摂水を行わなくても生存することを可能にさせている．しかしながら，血中の総蛋白質やアルブミン濃度は冬眠中に増加するため，軽度の脱水状態にあるといえる（Græsli et al., 2015; Stenvinkel et al., 2013）．

クマの冬眠において驚くべき点の一つは，一切の排尿を行わないのにもかかわらず，血中の尿素が増加しないどころか，逆に減少するということであろう．尿素分解酵素を持たない哺乳類は，尿として排泄すること以外に調節する術をもたない．人であれば腎機能障害などの要因で尿素の体外への排泄が滞ると高窒素血症となり，尿毒症を呈し死に至る可能性がある．過去に行われた研究では，夏場において絶食・絶水状態におかれたクマは脱水と高窒素血症を示したことから（Nelson et al., 1975），この能力は冬眠期特異的に発揮されるものである．クマにおいて血中尿素窒素を低く保つことができる要因としては，筋蛋白の分解が低く抑えられることが挙げられる（Tinker et al., 1998）．クマでは長期の不動化状態にもかかわらず，筋肉の廃用性萎縮は生じず，冬眠期を通してわずか 23% しか筋力が低下しない（Harlow et al., 2001）．この仕組みについては本号掲載の宮崎氏による解説に詳しく記載されているので，ご一読頂きたい．また一方で，肝臓における尿素サイクルに関わる酵素群の遺伝子発現が低下することが明らかとなっており（Jansen et al., 2019），尿素そのものの生成も抑制されていると考えられる．しかしながら，いずれの事象もなぜ尿素が“低下”するのかを説明するに十分とはいえない．この機序に関しては，腸管内に排出した尿素を，尿素分解酵素を有する腸内細菌がアンモニアへと変換し，それをクマが腸管から再吸収することでアミノ酸の再合成を行っているのではないかという「尿素リサイクル仮説」が古くから提唱されてきた（Nelson et al., 1975）．実際，近年になり冬眠中のジュウサンセンジリス（*Ictidomys tridecemlineatus*）においてこの機構が存在することが証明されている（Regan et al., 2022）．しかしながらクマにおいては，冬眠中の腸内細菌叢を明らかにした研究はあるものの（Sommer et al., 2016），尿素リサイクル機構の存在を示唆する結果は得られていない．この機序が解明されれば，人における腎疾患の治療法の開発など，医療への応用が期待できるであろう．

4. おわりに

クマの冬眠に関する研究は，もともとクマの生物学を専門にする研究者を中心に発展してきたが，2010 年代に入ると医師や微生物学者など，幅広い専門性を有する研究者が参画することにより，大きく発展してきている分野である．特に近年では，医学的見地からクマの冬眠の特異性が広く注目を集めている（von Linde et al., 2015）．上述した点以外にも，長期の不動化状態にもかかわらず，なぜ骨粗鬆症が生じないのか？（Donahue et al., 2021; Nasoori et al., 2020），コレステロールなど血中の脂質成分が高濃度にもかかわらず，なぜアテローム性動脈硬化症や血栓症が生じないのか？（Giroud et al., 2021; Samal et al., 2021），長期の徐脈状態にもかかわらず，なぜ心室拡張などの循環器障害が生じないのか？（Nelson & Robbins, 2010; Nelson et al., 2008），といった視点から，近年様々な研究が行われてきている．クマの冬眠は他の小型冬眠性哺乳類と異なり，組織・細胞レベルでの低温耐性の上に成り立っている仕組みではないという点において，より人に近い動物モデルと捉えることが可能であり，人の医療への貢献が期待できる．一方で，生体を用いた研究には供試できる動物の数や実施可能な環境に限りがあることや，ゲノム編集など遺伝子工学技術を用いた実験操作を行うことができないなど，研究には大きな制約が存在する．このため今後は，*in vitro* 実験を併用した研究が主流となっていくであろう（Saxton et al., 2022）．長い進化の時を経てクマが獲得してきた独特な冬眠の謎に人類がどれだけ迫れるのか，今後の研究の発展に期待したい．

参考文献

Ahlquist, D. A., Nelson, R. A., Steiger, D. L., Jones, J. D., & Ellefson, R. D. (1984). Glycerol metabolism in the hibernating black bear. J Comp Physiol B, 155(1), 75–79.

Andrews, M. T., Russeth, K. P., Drewes, L. R., & Henry, P. G. (2009). Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 296(2), R383–393. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90795.2008

Bal, N. C., Maurya, S. K., Sopariwala, D. H., Sahoo, S. K., Gupta, S. C., Shaikh, S. A., Pant, M., Rowland, L. A., Goonasekera, S. A., Molkentin, J. D., & Periasamy, M. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. Nat Med, 18(10), 1575–1579. https://doi.org/10.1038/nm.2897

Buresh, C. T., Folk, G. E., Dickson, E. W., & Thrift, D. L. (2010). Comparing hypothermia in the human and the black bear (*Ursus americanus*). Biol Rhythm Res, 41(4), 247–257. https://doi.org/10.1080/09291010802568756

Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M., & Yamaguchi, Y. (2016). Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. R Soc Open Sci, 3(4), 16002. https://doi.org/10.1098/rsos.160002

Dark, J. (2005). Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. Annu Rev Nutr, 25, 469–497. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092514

Davis, W. L., Goodman, D. B. P., Crawford, L. A., Cooper, O. J., & Matthews, J. L. (1990). Hibernation activates glyoxylate cycle and gluconeogenesis in black bear brown adipose tissue. Biochim Biophys Acta, 1051(3), 276–278. https://doi.org/10.1016/0167-4889(90)90133-X

Donahue, S. W., Wojda, S. J., McGee-Lawrence, M. E., Auger, J., & Black, H. L. (2021). Osteoporosis prevention in an extraordinary hibernating bear. Bone, 145, 115845. https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115845.

Evans, A. L., Singh, N. J., Friebe, A., Arnemo, J. M., Laske, T. G., Frobert, O., Swenson, J. E., & Blanc, S. (2016). Drivers of hibernation in the brown bear. Front Zool, 13, 7. https:// //doi.org/10.1186/s12983-016-0140-6

Fedorov, V. B., Goropashnaya, A. V., Toien, O., Stewart, N. C., Gracey, A. Y., Chang, C., Qin, S., Pertea, G., Quackenbush, J., Showe, L. C., Showe, M. K., Boyer, B. B., & Barnes, B. M. (2009). Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). Physiol Genomics, 37(2), 108–118. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90398.2008

Giroud, S., Chery, I., Arrive, M., Prost, M., Zumsteg, J., Heintz, D., Evans, A. L., Gauquelin-Koch, G., Arnemo, J. M., Swenson, J. E., Lefai, E., Bertile, F., Simon, C., & Blanc, S. (2021). Hibernating brown bears are protected against atherogenic dyslipidemia. Sci Rep, 11(1), 18723. https://doi.org/10.1038/s41598-021-98085-7

Gonzalez-Bernardo, E., Russo, L. F., Valderrabano, E., Fernandez, A., & Penteriani, V. (2020). Denning in brown bears. Ecol Evol, 10(13), 6844–6862. https://doi.org/10.1002/ece3.6372

Græsli, A. R., Evans, A. L., Fahlman, A., Bertelsen, M. F., Blanc, S., & Arnemo, J. M. (2015). Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. BMC Vet Res, 11, 301. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0615-2

Harlow, H. J., Lohuis, T., Beck, T. D., & Iaizzo, P. A. (2001). Muscle strength in overwintering bears. Nature, 409(6823), 997. https://doi.org/10.1038/35059165

Harlow, H. J., Lohuis, T., Grogan, R. G., & Beck, T. D. I. (2002). Body mass and lipid changes by hibernating reproductive and nonreproductive black bears (*Ursus americanus*). J Mammal, 83(4), 1020–1025. https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083<1020:Bmalcb>2.0.Co;2

Hashimoto, Y. (2002). Seasonal food habits of the Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in the Chichibu mountains, Japan. Mammal Study, 27, 65–72. https://doi.org/10.3106/mammalstudy.27.65

Hellgren, E. C. (1998). Physiology of hibernation in bears. Ursus, 10, 467–477.

Hilderbrand, G. V., Jenkins, S. G., Schwartz, C. C., Hanley, T. A., & Robbins, C. T. (1999). Effect of seasonal differences in dietary meat intake on changes in body mass and composition in wild and captive brown bears. Can J Zool, 77(10), 1623–1630. https://doi.org/DOI 10.1139/z99-133

Hissa, R., Siekkinen, J., Hohtola, E., Saarela, S., Hakala, A., & Pudas, J. (1994). Seasonal patterns in the physiology of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*) in Finland. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 109(3), 781–791. https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90222-4.

Jansen, H. T., Trojahn, S., Saxton, M. W., Quackenbush, C. R., Evans Hutzenbiler, B. D., Nelson, O. L., Cornejo, O. E., Robbins, C. T., & Kelley, J. L. (2019). Hibernation induces widespread transcriptional remodeling in metabolic tissues of the grizzly bear. Commun Biol, 2, 336. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0574-4

Jones, J. D., Burnett, P., & Zollman, P. (1999). The glyoxylate cycle: does it function in the dormant or active bear? Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 124(2), 177–179. https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00109-1

Kamine, A., Shimozuru, M., Shibata, H., & Tsubota, T. (2012). Changes in blood glucose and insulin responses to intravenous glucose tolerance tests and blood biochemical values in adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn J Vet Res, 60(1), 5–13. doi:10.14943/jjvr.60.1.5

Krofel, M., Spacapan, M., & Jerina, K. (2017). Winter sleep with room service: denning behaviour of brown bears with access to anthropogenic food. J Zool, 302(1), 8–14. https://doi.org/10.1111/jzo.12421

Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. Diabetes Metab Res Rev, 15(6), 412–426. https://doi.org/10.1002/ (SICI) 1520-7560 (199911/12) 15: 6<412:: AID-DMRR72>3.0.CO;2-8

Laske, T. G., Garshelis, D. L., & Iaizzo, P. A. (2011). Monitoring the wild black bear's reaction to human and environmental stressors. BMC Physiol, 11, 13. https://doi.org/10.1186/1472-6793-11-13

Nakamura, S., Okano, T., Yoshida, Y., Matsumoto, A., Murase, Y., Kato, H., Komatsu, T., Asano, M., Suzuki, M., Sugiyama, M., & Tsubota, T. (2008). Use of bioelectrical impedance analysis to measure the fat mass of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). Jpn J Zoo Wildl Med, 13(1), 15–20.

Nasoori, A., Okamatsu-Ogura, Y., Shimozuru, M., Sashika, M., & Tsubota, T. (2020). Hibernating bear serum hinders osteoclastogenesis in-vitro. PLoS ONE, 15(8), e0238132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238132

Nelson, O. L., & Robbins, C. T. (2010). Cardiac function adaptations in hibernating grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). J Comp Physiol B, 180(3), 465–473. https://doi.org/10.1007/s00360-009-0421-x

Nelson, O. L., Robbins, C. T., Wu, Y. M., & Granzier, H. (2008). Titin isoform switching is a major cardiac adaptive response in hibernating grizzly bears. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 295(1), H366-H371. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00234.2008

Nelson, R., Folk, G. E. J., Pfeiffer, E. W., Craighead, J. J., Jonkel, C. J., & Steiger, D. L. (1983). Behavior, biochemistry, and hibernation in black, grizzly, and polar bears. Ursus, 5, 284–290.

Nelson, R. A., Jones, J. D., Wahner, H. W., Mcgill, D. B., & Code, C. F. (1975). Nitrogen metabolism in bears: urea metabolism in summer starvation and in winter sleep and role of urinary bladder in water and nitrogen conservation. Mayo Clin Proc, 50(3), 141–146.

Perry, B. W., Armstrong, E. E., Robbins, C. T., Jansent, H. T., & Kelley, J. L. (2022). Temporal analysis of gene expression and isoform switching in brown bears (*Ursus arctos*). Integ Comp Biol, icac093. https://doi.org/10.1093/icb/icac093

Regan, M. D., Chiang, E., Liu, Y. X., Tonelli, M., Verdoorn, K. M., Gugel, S. R., Suen, G., Carey, H. V., & Assadi-Porter, F. M. (2022). Nitrogen recycling via gut symbionts increases in ground squirrels over the hibernation season. Science, 375(6579), 460–463. https://doi.org/10.1126/science.abh2950

Rigano, K. S., Gehring, J. L., Hutzenbiler, B. D. E., Chen, A. V., Nelson, O. L., Vella, C. A., Robbins, C. T., & Jansen, H. T. (2017). Life in the fat lane: seasonal regulation of insulin sensitivity, food intake, and adipose biology in brown bears. J Comp Physiol B, 187(4), 649–676. https://doi.org/10.1007/s00360-016-1050-9

Samal, S. K., Frobert, O., Kindberg, J., Stenvinkel, P., & Frostegard, J. (2021). Potential natural immunization against atherosclerosis in hibernating bears. Sci Rep, 11(1), 12120. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91679-1

Saxton, M. W., Perry, B. W., Evans Hutzenbiler, B. D., Trojahn, S., Gee, A., Brown, A. P., Merrihew, G. E., Park, J., Cornejo, O. E., MacCoss, M. J., Robbins, C. T., Jansen, H. T., & Kelley, J. L. (2022). Serum plays an important role in reprogramming the seasonal transcriptional profile of brown bear adipocytes. iScience, 25(10), 105084. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105084

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., & Tsubota, T. (2013). Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. J Mammal, 94(3), 618–627. https://doi.org/10.1644/12-Mamm-a-246.1

Shimozuru, M., Kamine, A., & Tsubota, T. (2012a). Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during hibernation in captive, adult, female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 163(2), 254–261. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.06.007

Shimozuru, M., Kamine, A., & Tsubota, T. (2012b). Changes in expression of hepatic genes involved in lipid metabolism during prehibernation period in captive adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Can J Zool, 90(8), 945–954. https://doi.org/10.1139/Z2012-062

Shimozuru, M., Nagashima, A., Tanaka, J., & Tsubota, T. (2016). Seasonal changes in the expression of energy metabolism-related genes in white adipose tissue and skeletal muscle in female Japanese black bears. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 196, 38–47. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.001

Shimozuru, M., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Moriwaki, J., Mori, F., Tsujino, M., Shirane, Y., Ishinazaka, T., Kasai, S., Nose, T., Masuda, Y., & Tsubota, T. (2017). Reproductive parameters and cub survival of brown bears in the Rusha area of the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. PLoS ONE, 12(4), e0176251. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176251

Shirane, Y., Jimbo, M., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Mori, F., Ishinazaka, T., Sashika, M., Tsubota, T., & Shimozuru, M. (2021). Dining from the coast to the summit: Salmon and pine nuts determine the summer body condition of female brown bears on the Shiretoko Peninsula. Ecol Evol, 11(10), 5204–5219. https://doi.org/10.1002/ece3.7410

Sommer, F., Stahlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J. M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C. B., Frobert, O., & Backhed, F. (2016). The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. Cell Rep, 14(7), 1655–1661. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.026

Stenvinkel, P., Frobert, O., Anderstam, B., Palm, F., Eriksson, M., Bragfors-Helin, A. C., Qureshi, A. R., Larsson, T., Friebe, A., Zedrosser, A., Josefsson, J., Svensson, M., Sahdo, B., Bankir, L., & Johnson, R. J. (2013). Metabolic changes in summer active and anuric hibernating free-ranging brown bears (*Ursus arctos*). PLoS ONE, 8(9), e72934. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072934

Swenson, J. E., Adamic, M., Huber, D., & Stokke, S. (2007). Brown bear body mass and growth in northern and southern Europe. Oecologia, 153(1), 37–47. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0715-1

Tinker, D. B., Harlow, H. J., & Beck, T. D. (1998). Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. Physiol Biochem Zool, 71(4), 414–424. https://doi.org/10.1086/515429

Tøien, Ø., Blake, J., & Barnes, B. M. (2015). Thermoregulation and energetics in hibernating black bears: metabolic rate and the mystery of multi-day body temperature cycles. J Comp Physiol B, 185(4), 447–461. https://doi.org/10.1007/s00360-015-0891-y

Tøien, Ø., Blake, J., Edgar, D. M., Grahn, D. A., Heller, H. C., & Barnes, B. M. (2011). Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. Science, 331(6019), 906–909. https://doi.org/10.1126/science.1199435

von Linde, M. B., Arevstrom, L., & Frobert, O. (2015). Insights from the den: how hibernating bears may help us understand and treat human disease. Clin Transl Sci, 8(5), 601–605. https://doi.org/10.1111/cts.12279

加味根あかり，下鶴倫人，坪田敏男．（2010）．ニホンツキノワグマにおける冬眠前の脂肪蓄積メカニズム（特集　クマの保全医学の研究動向）．獣医畜産新報．63（5）367–370.

低温科学 81 （2023） 191–198
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 191

ツキノワグマにおける冬眠期の筋肉量維持機構の探索

宮﨑　充功[1)]

2022 年 12 月 6 日受付，2022 年 12 月 28 日受理

身体活動量低下に伴う筋肉量減少は，ヒトにおいては不可避の生理応答現象であり，最終的に運動機能や QOL の大幅な低下をもたらす．一方クマ類をはじめとする冬眠哺乳動物には，長期間の不活動・栄養不良を経験しても筋肉量や発揮筋力が極めて良く保存される，骨格筋萎縮耐性ともいえる未解明の生理機能が存在する．本稿では大型冬眠哺乳動物であるツキノワグマを対象とした検討をもとに，冬眠に伴う骨格筋タンパク質代謝制御機構の変化について概説する．冬眠哺乳動物がどのような適応機構を用いて骨格筋萎縮耐性を獲得するのかを解明することで，サルコペニア予防や寝たきり防止などヒトの健康寿命延伸に繋がる魅力的な戦略を提供することができる．

Regulation of Muscle Mass Maintenance During Hibernation in the Asiatic Black Bears

Mitsunori Miyazaki[1]

Hibernating bears experience prolonged periods of torpor and starvation during winter for up to 5–7 months. Though physical inactivity and malnutrition generally lead to profound loss of muscle mass and metabolic dysfunction in humans, hibernating bears show limited muscle atrophy and can successfully maintain locomotive function. These physiological features in bears allow us to hypothesize that hibernating bears uniquely alter the regulation of protein and energy metabolism in skeletal muscle which then contributes to “muscle atrophy resistance” against continued physical inactivity. This review provides an overview of the alterations in the regulatory system of skeletal muscle protein metabolism during hibernation in the Asiatic black bears.

キーワード：ツキノワグマ，骨格筋，タンパク質合成，タンパク質分解，エネルギー代謝
Asiatic Black Bears, Skeletal Muscle, Protein Synthesis, Protein Degradation, Energy Metabolism

1. 身体活動レベルと骨格筋量の変化

1.1 ―Use It or Lose It―　筋肉は使わないと衰える

骨格筋（身体運動を行うための横紋筋）はヒト身体重量の約 40%程度を占め，立つ・歩くといった身体運動に必要なパワーの発揮のみならず，エネルギー代謝や熱産生，また近年では内分泌器官としての関与も報告されるなど，ヒトの身体機能を制御する最も重要な組織の 1 つである（Janssen et al., 2000）．骨格筋は，運動・トレーニングなどで使えば使うほど強く・大きくなり（骨格筋肥大），一方で怪我や疾患，または重力負荷の減少（宇宙滞在など）の影響により不活動状態に陥ると弱く・小さく衰えていき（骨格筋萎縮），その後の身体機能の回復や QOL の維持に大きな影響をおよぼす（Miyazaki & Esser,

連絡先
宮﨑　充功
広島大学大学院医系科学研究科生理機能情報科学
〒734–8553　広島市南区霞一丁目 2 番 3 号
Tel. ＋81–82–257–5435
e-mail：mmiya4@hiroshima-u.ac.jp

1）広島大学大学院医系科学研究科生理機能情報科学
〒734–8553　広島市南区霞一丁目 2 番 3 号
Department of Integrative Physiology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University
1–2–3 Kasumi, Minami-Ku, Hiroshima, 734–8553 JAPAN

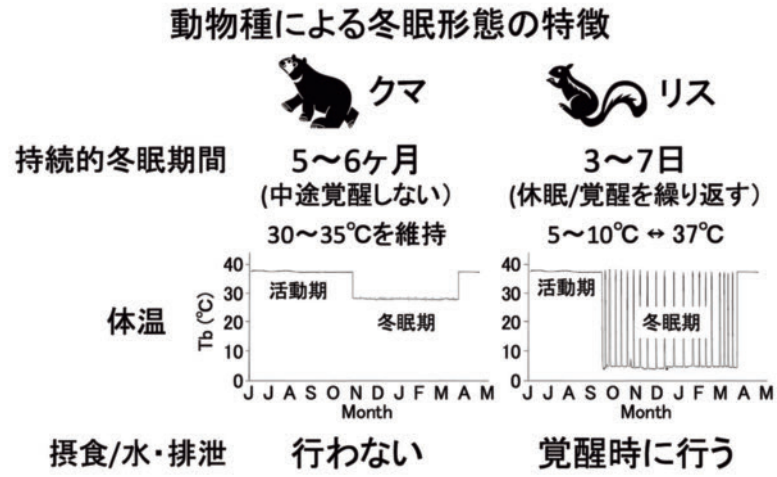


図 1：動物種による冬眠形態の特徴

2009; Sartori et al., 2021).「筋肉量が減少し，筋力や身体機能が低下している状態」をサルコペニアといい，加齢や不活動，内分泌系因子の変化，骨格筋幹細胞数の減少や活性化不全など様々な要因が複合的に関与することにより引き起こされる（加齢による筋肉量減少は一次性サルコペニア，加齢以外が原因となる筋肉量減少は二次性サルコペニアに分類される）(Cruz-Jentoft et al., 2019)．サルコペニアは高齢者の転倒や寝たきりリスクとなるだけでなく，各種疾患への罹患率上昇や生命予後不良，QOL 低下に直結するため，サルコペニアの発症予防方法や効果的なリハビリテーション手法を開発することは，ヒトの健康寿命を延伸する上で極めて重要な課題といえる．現在のところ，最も効果的なサルコペニアの防止・改善方法は身体運動（いわゆる筋トレやリハビリテーション）であるが（Cruz-Jentoft & Sayer, 2019)，怪我や疾患の影響により身体運動自体が困難である場合や，フレイル（虚弱）を呈する高齢者など一定強度以上の身体運動が負荷できない場合，または安静が必要で身体運動が禁忌である場合など，不活動による身体の衰え（廃用症候群）が避けられない場面も臨床的には多く存在する．

1.2　— No Use but No Lose —　使わなくても衰えない冬眠哺乳動物の筋肉

動物にとって「冬眠」は，食物不足や低温といった冬期環境を生き抜くための生存戦略である．大変興味深いことに，クマやリスなどの冬眠哺乳動物は，半年間におよぶ長期の不活動・栄養不良を経験するにも関わらず様々な身体機能を維持することができる，“使わなくても衰えない身体”という特性を有している（Gonzalez-Bernardo et al., 2020; Ivakine & Cohn, 2014)．ヒト骨格筋の場合，ベッドレストや関節固定などの不活動状態に陥ると筋タンパク質量や筋線維サイズは 1 日あたり 0.5–1.0％程度の割合で減少し，サルコペニアの進行が加速される（de Boer et al., 2007; Rennie et al., 2010)．しかし冬眠哺乳動物の場合，骨格筋の大きさや発揮される筋力が冬眠前後で全く変化しない（Andres-Mateos et al., 2013)，または一定程度は減少するがヒトに比較して非常に軽微である（Harlow et al., 2001）という，筋肉の衰えを防ぐことができる骨格筋萎縮耐性ともいえる未解明の生理機能が存在する．

リスやハムスターなどの小型動物では，冬眠中は体温のセットポイントを環境温と同程度に低下させ，全身のエネルギー代謝を一時的に減少させる．また数日間隔で中途覚醒・復温を繰り返し，摂食・摂水・排泄を行いながら冬眠期間を乗り越える（Andres-Mateos et al., 2013; Buck & Barnes, 1999）（図 1)．小型冬眠哺乳動物であるジュウサンセンジリスを用いた先行研究では，活動期と冬眠期の骨格筋形態を比較したところ，骨格筋線維サイズや筋線維タイプに差異は全く認められていない（Andres-Mateos et al., 2013)．一方クマなどの大型動物の場合，冬眠中は基本的に中途覚醒しない，体温低下が比較的軽微（夏期：37–38℃，冬期：30–35℃)，摂食・摂水・排泄を一切しないといった特徴を示す（Toien et al., 2011)．冬眠前後においてアメリカクロクマの発揮筋力（電気刺激に伴う関節トルクを測定）を測定した場合，一定程度（20％程度の減少）の筋力低下は認められるものの，その減少割合がヒト骨格筋に比較して非常に軽微であることが報告されている（Harlow et al., 2001)．ツキノワグマ骨格筋を対象に骨格筋線維サイズを測定した我々の報告においても，冬眠前後（冬眠前：11 月下旬，冬眠後：4 月中旬，同一個体間の比較ではない点に注意）

を比較した場合に筋線維サイズの減少を認めているが，先行研究と同様に軽微な筋肉量減少にとどまっていた（Miyazaki et al., 2019）．一方でたとえ冬眠哺乳動物であっても，夏季に筋活動量が制限されると骨格筋量は大きく減少することが報告されている（Lin et al., 2012）．ヒグマの下腿を支配する末梢運動神経（総腓骨神経）を外科的に切断した場合，夏季活動期では筋肉量が大きく減少する（11 週間で 58–61％の筋横断面積減少）が，冬眠期ではその減少割合が極めて低くなっていた（除神経をしても筋肉量の減少は 18–25％に留まる）．つまり冬眠哺乳動物における骨格筋萎縮耐性とは，リスやクマなど特定の生物種のみが生得的に常時有する生命機能ではなく，冬眠に伴い誘導される何らかの生理学的応答の結果もたらされる適応機構だと考えられる．

2. 冬眠に伴うクマ骨格筋のタンパク質代謝とエネルギー代謝の調節

2.1 筋肉量の規定因子としてのタンパク質代謝

骨格筋は終末分化した多核細胞である骨格筋線維の集合体であり，骨格筋量の増加（筋肥大）や減少（筋萎縮）といった組織全体の量的変化は，筋細胞内におけるタンパク質の合成および分解の代謝バランスの総和によって規定される．つまり骨格筋量を維持するためには，「筋細胞内のタンパク質合成と分解が平衡な状態」を保つことが必要となってくる．冬眠哺乳動物の骨格筋では，冬眠期の筋タンパク質ターンオーバー率は夏季活動期に比較して相対的に低下しており，この筋タンパク質代謝レベルの減少が筋肉量維持に貢献しているものと考えられている（Bertile et al., 2021）．放射性同位元素を用いたトレーサー法でアメリカクロクマの筋タンパク質代謝を直接的に測定した先行研究では，冬眠中のクマ骨格筋では，タンパク質合成効率および分解効率ともに夏季活動期に比較して顕著に抑制されるものの，両者は平衡状態を保ち，全体の総和として筋肉量の維持に貢献することが示されている（Lohuis et al., 2007）．現在のところ，クマ骨格筋に限定した場合，冬眠に伴う筋タンパク質代謝制御機構の適応変化について検討した例は多くない．いくつかの先行研究では，冬眠中のアメリカクロクマ（Fedorov et al., 2009）やハイイログマ（Jansen et al., 2019）の骨格筋では，タンパク質の生合成やリボソーム新生に関与する遺伝子群が発現上昇すること，タンパク質分解や筋萎縮に関与する遺伝子群の発現が抑制される可能性などが骨格筋遺伝子発現の網羅的解析により示されている．またヒグマ骨格筋を対象にプロテオミクス解析を行った研究では，冬眠に伴い骨格筋における脂質酸化レベルが抑制される一方で，解糖系による代謝レベルは冬眠期でも比較的維持されることが報告されている（Chazarin et al., 2019）．

2.2 冬眠に伴うツキノワグマ骨格筋のタンパク質代謝制御機構の変化

2.2.1 冬眠中のツキノワグマ骨格筋は衰えていない

我々はツキノワグマ骨格筋を対象に，筋タンパク質合成および分解を制御する細胞内シグナル伝達機構について詳細な検討を行っている．この検討には，クマ飼育に特化した専用施設（北秋田市クマクマ園）にて管理・飼養されているツキノワグマを用いているため，捕獲された野生動物を用いた研究に伴う諸問題（飼育環境や栄養状態，介入のタイミング，同一個体からの複数サンプリングの困難性など）の多くを排除することが可能となった．冬眠期（2 月下旬）ツキノワグマの片脚から大腿四頭筋を採取し，活動期（7 月中旬）に同一個体の対側脚から採取した筋肉との比較分析を行ったところ，体重や骨格筋線維サイズ，遅筋・速筋線維のタイプ割合などに全く変化は認められなかった（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）．骨格筋を採取した活動期（7 月）および冬眠期（2 月）は，それぞれツキノワグマの体重の増加期および減少期に相当するため単純な比較は難しいが（Hashimoto & Yasutake, 1999），少なくともこの 2 点間を比較した場合，冬眠期のツキノワグマ骨格筋は活動期と比べて廃用性変化（骨格筋線維サイズ減少や速筋への線維タイプ移行）を全く示していない（図 2）．

2.2.2 タンパク質合成制御系の変化

骨格筋を含む様々な組織において，タンパク質合成を正に制御する分子機構として，セリン / スレオニンキナーゼである mTOR（mechanistic target of rapamycin）を中心とした細胞内シグナル伝達系の関与が示されている．mTOR は，その他の機能タンパク質と共に複合体を形成して種々の細胞内機能を調節するが，このうち mTORC1 複合体はリボソームにおける mRNA からタンパク質への翻訳開始や伸長を制御する 4EBP-1（eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein-1）や S6K1（p70 ribosomal S6 kinase 1）などの機能分子をリン酸化することで，細胞内におけるタンパク質合成を促進している．冬眠期のツキノワグマ骨格筋が筋肉量減少や筋線維タイプ移行といった廃用性変化を示していなかったことから，mTORC1 を中心とするシグナル伝達系の適応変化についても検討した．その結果，mTORC1 の

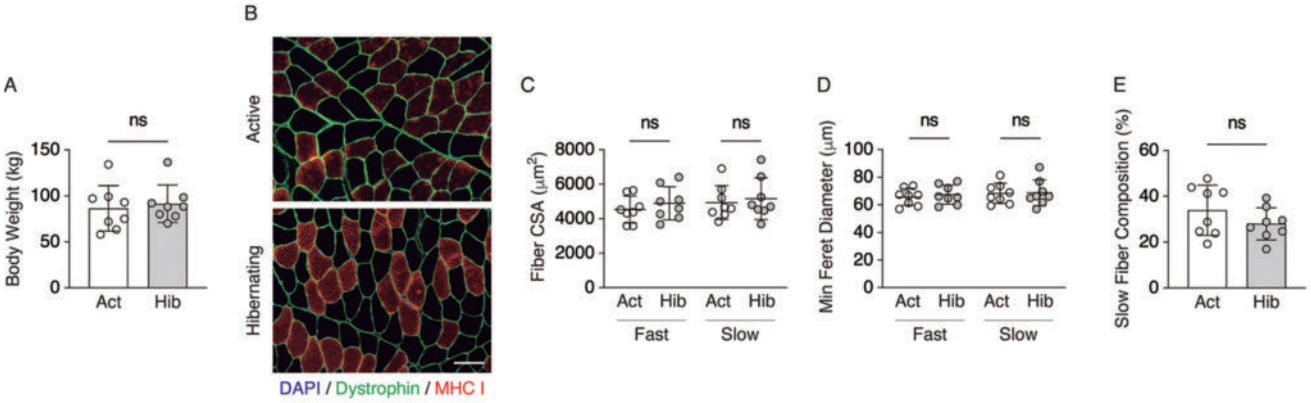


図 2：活動期／冬眠期におけるツキノワグマの体重および骨格筋組織の形態特性．A）体重，B）筋線維横断面の免疫組織染色像（赤色；遅筋線維，黒色；速筋線維，緑色；ジストロフィン），C）筋線維横断面積，D）筋線維の短径，E）遅筋線維の比率，活動期（Act）と冬眠期（Hib）を比較した場合，体重（A）や筋線維の大きさ（B，C，D），筋線維タイプの比率（E）などに全く変化が認められない．（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）より一部改変．

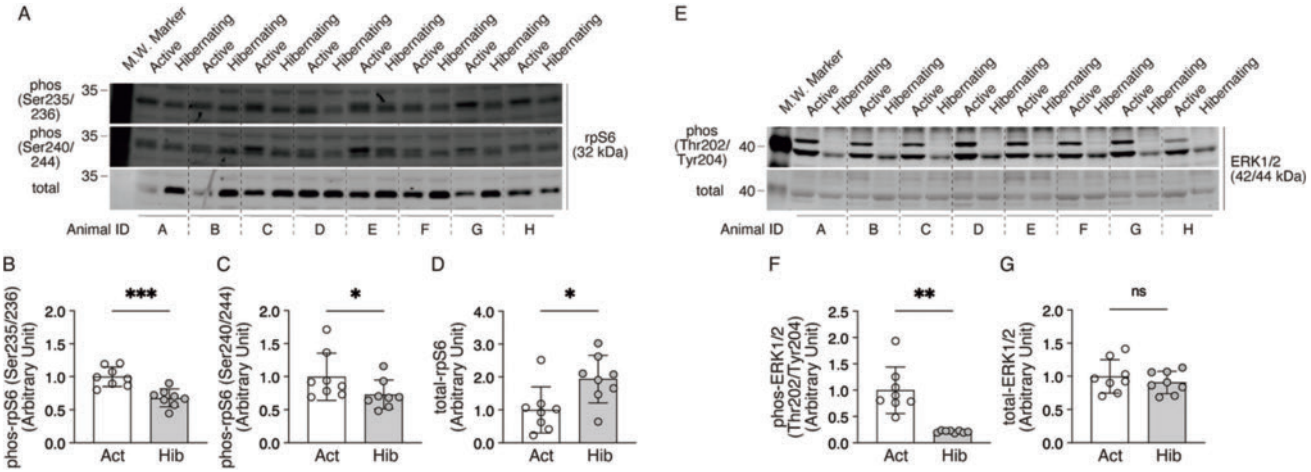


図 3：骨格筋タンパク質合成を制御するシグナル伝達系の活性化状態の変化．A-D）mTOR 経路の下流に存在する ribosomal protein S6 のリン酸化および総タンパク質量の変化，E-G）ERK1/2 のリン酸化および総タンパク質量の変化，それぞれのシグナル伝達系の活性化状態を示すリン酸化タンパク質量が，活動期（Act）に比較し，冬眠期（Hib）の骨格筋において顕著に減少する．（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）より一部改変．

機能的活性を示す指標となる下流因子の S6K1 や rpS6 のリン酸化状態が，冬眠期のツキノワグマ骨格筋において顕著に抑制されていた（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）（図 3）．また細胞内タンパク質合成系の主要な制御シグナルである Akt/GSK3（glycogen synthase kinase 3）経路や，mTORC1 依存性／非依存性経路への入力を介して筋タンパク質合成を正に制御する MEK（mitogen-activated protein kinase kinase）/ ERK（extracellular signal-regulated kinase）経路も，冬眠期ツキノワグマ骨格筋において顕著なリン酸化状態の低下が認められている．MEK/ERK 依存性のシグナル入力は，様々な種類の細胞において細胞増殖や成長，分化といった多種多様な細胞プロセスに関与する情報伝達系として知られる．特に骨格筋では，筋肉の収縮活動や機械的刺激（張力発揮やストレッチなど）などメカニカルストレス依存性に活性化されるため（Miyazaki et al., 2011），MEK/ERK 経路のリン酸化状態の低下は，冬眠期間中の筋肉の活動性低下や力学的負荷量の減少を反映していると考えることができる．

2.2.3　タンパク質分解制御系の変化

骨格筋タンパク質の主要な分解経路としては，ユビキチン-プロテアソーム系およびオートファジー-リソソーム系を介した制御系の関与が示されている（Sartori et al., 2021）．ユビキチン-プロテアソーム系では，タンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し，ATP 依存性かつ選択的に標的タンパク質を分解する．特に骨格筋萎縮（muscle atrophy）の際には，筋特異的に発現する E3 ユビキチンリガーゼである Atrogin1 や MuRF1（muscle RING finger protein 1）といった因子

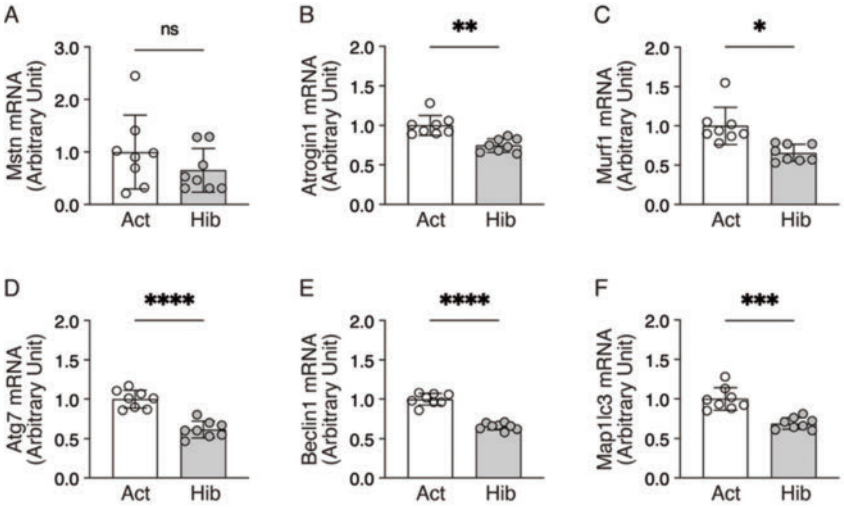


図 4：骨格筋タンパク質分解系制御因子の遺伝子発現変化．Ub-Proteasome 系に含まれる Atrogin1（B）や Murf1（C），オートファジー系に関与する各因子（D-F）の遺伝子発現量は，いずれの指標も活動期（Act）に比較し，冬眠期（Hib）の骨格筋において顕著に抑制される．骨格筋量の負の制御因子である Mstn（A）の遺伝子発現量については，有意な変化は観察されていない．（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）より一部改変．

の発現量が増加して筋タンパク質分解を促進することから，これらの因子は Atrogenes などとも呼ばれる（Bodine et al., 2001）．一方オートファジー系では，オートファゴソームという隔離膜で囲まれた細胞質空間を丸ごと消化するため，選択的なタンパク質分解機構であるユビキチン–プロテアソーム系に対して，タンパク質のバルク分解系とも呼ばれる．骨格筋においては，栄養不良や飢餓状態，筋変性疾患などで活性化されることが示されている（Milan et al., 2015）．冬眠期のツキノワグマ骨格筋において，ユビキチン–プロテアソーム系（Atrogin1 および Murf1 遺伝子発現量）およびオートファジー–リソソーム系に関与する各因子（Atg7，Beclin 1 および Map1lc3）の遺伝子発現量を測定したところ，活動期に比較して，いずれのタンパク質分解系に関与する因子も遺伝子発現量が顕著に減少していた（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）（図 4）．これらの結果から，ツキノワグマ骨格筋では冬眠中にユビキチン–プロテアソーム系およびオートファジー–リソソーム系依存性のタンパク質分解経路が不活性状態にあることが推測される．今後は筋タンパク質のユビキチン化やプロテアソーム活性の変化，オートファゴソーム形成など，実際のタンパク質分解効率が冬眠に伴いどの様に制御されているのかを明らかにする必要がある．また骨格筋量の負の制御因子として知られ，冬眠中に発現上昇する可能性が示唆されているミオスタチンの遺伝子発現量については，活動期・冬眠期の比較において有意な変化は観察されていない．

2.3 冬眠に伴うツキノワグマ骨格筋のエネルギー代謝系の変化

細胞内エネルギーセンサーとして知られる 5'-AMP-activated protein kinase（AMPK）は，ATP 加水分解に伴う AMP/ATP 比の上昇により活性化され，ATP 利用による細胞内の同化プロセスを抑制し，また ATP 生成のための異化経路を促進することでエネルギー恒常性を維持する役割を担う．骨格筋においては，AMPK の活性化がグルコース取り込みや脂肪酸 β 酸化を促進することが示されている．冬眠は長期間の絶食を伴うことから，細胞内エネルギー欠乏による AMP/ATP 比の相対的上昇が AMPK 活性化を引き起こすのではないかと我々は当初予想していた．しかしながら冬眠期ツキノワグマ骨格筋では，活動期に比較して AMPK のリン酸化および総タンパク質発現が有意に抑制されていた（Miyazaki, Shimozuru, Kitaoka, et al., 2022）．これはおそらく，冬眠期の骨格筋では ATP の加水分解が活発に行われず，AMP/ATP 比の相対的低下が誘導されているのであろう．実際に，ATP 産生が行われるミトコンドリアの関連制御因子のうち，脂肪酸 β 酸化の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase 1b（Cpt1β）や TCA 回路の第一段階を触媒する酵素であるクエン酸合成酵素（CS; citrate synthase），電子伝達系の制御因子の一つである cytochrome c（Cycs），ミトコンドリア新生の制御因子として知られる peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta（Pgc1β）などの遺伝子発現量や酵素活性（CS 活性）が冬眠期クマ骨

格筋において有意に抑制されていた．

2.4　冬眠期のツキノワグマ骨格筋は省エネモード

このように冬眠期のクマ骨格筋では，「タンパク質を作る」「タンパク質を壊す」というタンパク質代謝の調節系の両者を抑制することで，総和として筋肉という組織のタンパク質含量を維持することにより，筋肉の衰えを防止している様である．さらには，酸素を使いながら脂質・糖質からエネルギーを取り出す有酸素系エネルギー代謝を調節する各制御系も，活動期に比較して大きく抑制されることが明らかとなった．以上の適応変化は，長期の絶食を伴う冬眠期において筋肉を「省エネモード」に変化させることで，体内に蓄えられた脂質やタンパク質といった有限であるエネルギー源の無駄使いを防ぎ，冬季環境を生き抜くための適応戦略であろうと考えることができる．

3. 冬眠哺乳動物の骨格筋萎縮耐性を誘導する因子は？

現在のところ，使わないと衰えるという廃用性骨格筋萎縮の一次的な誘導要因は，筋タンパク質分解系（特にユビキチン–プロテアソーム系依存性のタンパク質分解経路）の活性化によるものであると考えられている．この点からも，冬眠期の骨格筋においてタンパク質分解系の制御機構が抑制されることは，不活動状態が継続しても筋肉量が減少しないという冬眠哺乳動物の特徴を説明する上で非常に合理的な適応であるといえる．しかしながら個体全体の適応として，この筋タンパク質分解系の抑制が何をトリガーとして誘導されているのか，現在も全くわかっていない．いくつかの先行研究では，冬眠期のクマ血清をラット筋組織（*ex vivo*）やヒト骨格筋由来筋管細胞（*in vitro*）の培地中に添加することで筋タンパク質分解が抑制され，筋タンパク質総量の増加に寄与することが示されている（Chanon et al., 2018; Fuster et al., 2007; Miyazaki, Shimozuru, & Tsubota, 2022）．一方で冬眠中のクマ骨格筋は，神経支配が失われた状態（除神経）でも骨格筋量維持に成功していることから，末梢組織である骨格筋への神経支配は筋量の維持に不可欠な要因ではないことが推察される（Lin et al., 2012）．従って，冬眠に伴い分泌される（もしくは分泌抑制される）体液性・全身性の生理活性物質が存在すること，さらにはその生理活性物質が筋タンパク質の分解抑制に関与している可能性が非常に高い．

4. 今後の展開

ヒトの場合，持続的な体温低下は全身臓器の機能不全（深部体温が 32–28℃ を下回ると昏睡・徐脈・徐呼吸が出現，25–20℃ を下回ると心停止）を引き起こし，生命活動を維持できなくなる．一方でフトオコビトキツネザルやピグミースローロリスなど，冬眠する霊長類も存在する（Dausmann et al., 2004; Ruf et al., 2015）．科学的には未検証だが，遭難事故から 24 日ぶりに発見された日本人男性（発見時直腸温 22℃，病院搬送後に心停止，発見まで意識消失状態で摂食・摂水をしていない）の生還例も興味深い（2007 年 1 月 24 日付　毎日新聞）．最近では，Q 神経という視床下部神経細胞群の選択的刺激により，非冬眠哺乳動物であるマウスが冬眠様状態（数日間持続する低体温・低代謝）を示すことも報告された（Takahashi et al., 2020）（小野の稿参照）．スイッチさえ入れることができれば，ヒトでも冬眠（能動的な低代謝状態を継続しながらの生命維持）に類似した生理状態を達成できるかもしれない．

冬眠哺乳動物は，生命維持のために一定程度のエネルギー代謝を維持しながら長期間の不活動・栄養不良を経験し，それでもなお筋肉がほとんど衰えないという，不思議な形質を備えている．冬眠期のクマ骨格筋では，筋肉を「省エネモード」に変化させることで筋タンパク質代謝を下げ（合成も分解もどちらも下げる），結果として筋肉量を維持させている様である．しかしながら，この冬眠という省エネモードのスイッチが何なのか，その特定には現在も至っていない．この因子の特定を含め，冬眠哺乳動物が有する「使わなくても衰えない筋肉」という未解明の仕組みを明らかにすることで，最終的にはヒトの寝たきり防止や効果的なリハビリテーション手法の開発などが期待される．

参考文献

Andres-Mateos, E., Brinkmeier, H., Burks, T. N., Mejias, R., Files, D. C., Steinberger, M., Soleimani, A., Marx, R., Simmers, J. L., Lin, B., Finanger Hedderick, E., Marr, T. G., Lin, B. M., Hourde, C., Leinwand, L. A., Kuhl, D., Foller, M., Vogelsang, S., Hernandez-Diaz, I., Vaughan, D. K., Alvarez de la Rosa, D., Lang, F., & Cohn, R. D. (2013, Jan). Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) is important to maintain skeletal muscle homeostasis and prevent atrophy. *EMBO Mol Med, 5*(1), 80–91. https://doi.org/10.1002/emmm.201201443

Bertile, F., Habold, C., Le Maho, Y., & Giroud, S. (2021). Body

Protein Sparing in Hibernators: A Source for Biomedical Innovation. *Front Physiol, 12*, 634953. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.634953

Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., & Glass, D. J. (2001, Nov 23). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science, 294*(5547), 1704–1708. https://doi.org/10.1126/science.1065874

Buck, C. L., & Barnes, B. M. (1999). Annual Cycle of Body Composition and Hibernation in Free-Living Arctic Ground Squirrels. *Journal of Mammalogy, 80*(2), 430–442. https://doi.org/10.2307/1383291

Chanon, S., Chazarin, B., Toubhans, B., Durand, C., Chery, I., Robert, M., Vieille-Marchiset, A., Swenson, J. E., Zedrosser, A., Evans, A. L., Brunberg, S., Arnemo, J. M., Gauquelin-Koch, G., Storey, K. B., Simon, C., Blanc, S., Bertile, F., & Lefai, E. (2018, Apr 3). Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci Rep, 8*(1), 5525. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23891-5

Chazarin, B., Storey, K. B., Ziemianin, A., Chanon, S., Plumel, M., Chery, I., Durand, C., Evans, A. L., Arnemo, J. M., Zedrosser, A., Swenson, J. E., Gauquelin-Koch, G., Simon, C., Blanc, S., Lefai, E., & Bertile, F. (2019). Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front Zool, 16*, 12. https://doi.org/10.1186/s12983-019-0312-2

Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyere, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older, P., & the Extended Group for, E. (2019, Jan 1). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing, 48*(1), 16–31. https://doi.org/10.1093/ageing/afy169

Cruz-Jentoft, A. J., & Sayer, A. A. (2019, Jun 29). Sarcopenia. *Lancet, 393*(10191), 2636–2646. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31138-9

Dausmann, K. H., Glos, J., Ganzhorn, J. U., & Heldmaier, G. (2004, Jun 24). Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature, 429* (6994), 825–826. https://doi.org/10.1038/429825a

de Boer, M. D., Selby, A., Atherton, P., Smith, K., Seynnes, O. R., Maganaris, C. N., Maffulli, N., Movin, T., Narici, M. V., & Rennie, M. J. (2007, Nov 15). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol, 585*(Pt 1), 241–251. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828

Fedorov, V. B., Goropashnaya, A. V., Toien, O., Stewart, N. C., Gracey, A. Y., Chang, C., Qin, S., Pertea, G., Quackenbush, J., Showe, L. C., Showe, M. K., Boyer, B. B., & Barnes, B. M. (2009, Apr 10). Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (Ursus americanus). *Physiol Genomics, 37*(2), 108–118. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90398.2008

Fuster, G., Busquets, S., Almendro, V., Lopez-Soriano, F. J., & Argiles, J. M. (2007, Oct). Antiproteolytic effects of plasma from hibernating bears: a new approach for muscle wasting therapy? *Clin Nutr, 26*(5), 658–661. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.07.003

Gonzalez-Bernardo, E., Russo, L. F., Valderrabano, E., Fernandez, A., & Penteriani, V. (2020, Jul). Denning in brown bears. *Ecol Evol, 10*(13), 6844–6862. https://doi.org/10.1002/ece3.6372

Harlow, H. J., Lohuis, T., Beck, T. D., & Iaizzo, P. A. (2001, Feb 22). Muscle strength in overwintering bears. *Nature, 409*(6823), 997. https://doi.org/10.1038/35059165

Hashimoto, Y., & Yasutake, A. (1999). Seasonal changes in body weight of female Asiatic black bears under captivity. *Mammal Study, 24*(1), 1–6. https://doi.org/10.3106/mammalstudy.24.1

Ivakine, E. A., & Cohn, R. D. (2014, Apr). Maintaining skeletal muscle mass: lessons learned from hibernation. *Exp Physiol, 99*(4), 632–637. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.074344

Jansen, H. T., Trojahn, S., Saxton, M. W., Quackenbush, C. R., Evans Hutzenbiler, B. D., Nelson, O. L., Cornejo, O. E., Robbins, C. T., & Kelley, J. L. (2019). Hibernation induces widespread transcriptional remodeling in metabolic tissues of the grizzly bear. *Commun Biol, 2*, 336. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0574-4

Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., & Ross, R. (2000, Jul). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *J Appl Physiol (1985), 89*(1), 81–88. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81

Lin, D. C., Hershey, J. D., Mattoon, J. S., & Robbins, C. T. (2012, Jun 15). Skeletal muscles of hibernating brown bears are unusually resistant to effects of denervation. *J Exp Biol, 215*(Pt 12), 2081–2087. https://doi.org/10.1242/jeb.066134

Lohuis, T. D., Harlow, H. J., & Beck, T. D. (2007, May). Hibernating black bears (Ursus americanus) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 147*(1), 20–28. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.020

Milan, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J. H., Frasson, L., Seydel, A., Zhao, J., Abraham, R., Goldberg, A. L., Blaauw, B., DePinho, R. A., & Sandri, M. (2015, Apr 10). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun, 6*, 6670. https://doi.org/10.1038/ncomms7670

Miyazaki, M., & Esser, K. A. (2009, Apr). Cellular mechanisms

regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol (1985), 106*(4), 1367–1373. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91355.2008

Miyazaki, M., McCarthy, J. J., Fedele, M. J., & Esser, K. A. (2011, Apr 1). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol, 589*(Pt 7), 1831–1846. https: //doi. org/10.1113/jphysiol. 2011. 205658

Miyazaki, M., Shimozuru, M., Kitaoka, Y., Takahashi, K., & Tsubota, T. (2022, Nov 16). Regulation of protein and oxidative energy metabolism are down-regulated in the skeletal muscles of Asiatic black bears during hibernation. *Sci Rep, 12*(1), 19723. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24251-0

Miyazaki, M., Shimozuru, M., & Tsubota, T. (2019). Skeletal muscles of hibernating black bears show minimal atrophy and phenotype shifting despite prolonged physical inactivity and starvation. *PLoS One, 14*(4), e0215489. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215489

Miyazaki, M., Shimozuru, M., & Tsubota, T. (2022). Supplementing cultured human myotubes with hibernating bear serum results in increased protein content by modulating Akt/FOXO3a signaling. *PLoS One, 17* (1), e0263085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263085

Rennie, M. J., Selby, A., Atherton, P., Smith, K., Kumar, V., Glover, E. L., & Philips, S. M. (2010, Feb). Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scand J Med Sci Sports, 20*(1), 5–9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.00967.x

Ruf, T., Streicher, U., Stalder, G. L., Nadler, T., & Walzer, C. (2015, Dec 3). Hibernation in the pygmy slow loris (Nycticebus pygmaeus): multiday torpor in primates is not restricted to Madagascar. *Sci Rep, 5*, 17392. https://doi.org/10.1038/srep17392

Sartori, R., Romanello, V., & Sandri, M. (2021, Jan 12). Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun, 12*(1), 330. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20123-1

Takahashi, T. M., Sunagawa, G. A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., & Sakurai, T. (2020, Jul). A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature, 583*(7814), 109–114. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2163-6

Toien, O., Blake, J., Edgar, D. M., Grahn, D. A., Heller, H. C., & Barnes, B. M. (2011, Feb 18). Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science, 331* (6019), 906–909. https: //doi. org/10. 1126/science.1199435

低温科学 81 （2023） 199–205
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 199

世界最寒冷地に生息するサル類・上高地のニホンザル群で進化した水生昆虫や魚類の捕食行動

東城　幸治[1, 2)]，竹中　將起[1, 2)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 5 日受理

サル類は熱帯や亜熱帯を中心に分布し，下北半島のニホンザル集団が「北限のサル」である．気温的には中部山岳域（上高地・志賀高原など）が世界最寒の生息域で，上高地には 4 群約 200 頭のニホンザルが生息する．このうち 3 群に属する複数個体が，厳冬季に水生昆虫類やイワナ類を捕食していることが究明された．サル類一般に，水を苦手とすることから，世界的な「サル類の行動・生態学」の観点からは驚愕的な行動といえる．本稿では，メディアとの連携により撮影された動画の分析から，餌資源の乏しい厳冬季に，水温の高い湧水を含む緩流条件下で，まず水草食が進化し，次いで水生昆虫食を介して魚食行動が進化したとするシナリオを提唱する．

Monkeys in the world’s coldest region - Predatory behavior of aquatic insects and fish evolved in the Japanese macaque group in the Kamikochi region

Koji Tojo[1] and Masaki Takenaka[2]

Monkeys, which are mainly distributed in the tropics and subtropics, do not prefer cold environments, and Japanese macaques inhabiting the Shimokita Peninsula in the Japanese Archipelago are considered to be at the “Northern limit of monkeys”. Monkeys inhabiting the alpine and sub-alpine zones of the central mountainous region of Japan, where the temperature is lower than that of the Shimokita Peninsula, are considered to be inhabiting the coldest environments for primates in the world, the Kamikochi area being such location. About 200 Japanese macaques inhabit the Kamikochi area, and consisting of four troupes currently. Among them, it was found that at least some individuals belonging to three of the troupes prey on aquatic insects and char fish during the severe winter. Since it is also well known that monkeys generally dislike water, this is a startling behavior from the viewpoint of the global “ethology and ecology of monkeys”. Herein, we review the process leading up to clarifying the fishing behavior of Japanese macaques in the Kamikochi area, and the results of analyzing video images obtained by introducing a large number of automatic filming systems in cooperation with a major professional media organization. In addition, we propose a scenario whereby during severe winters when food resources are scarce under relatively mild water conditions due to moderate temperature water flows from underground springs, herbivorous behavior evolved first, and subsequently evolved to diet for aquatic insects, and further adapting the fishing.

キーワード：ニホンザル，越冬戦略，食性，魚食，DNA メタバーコーディング
Japanese macaque, wintering, diet, fishing, DNA metabarcoding

連絡先
東城　幸治
信州大学　学術研究院　理学系
〒390-8621　長野県松本市旭 3-1-1
Tel. 0263-37-3341
e-mail：ktojo@shinshu-u.ac.jp
1）長野県松本市旭 3-1-1　信州大学学術研究院理学系
Biology Department, Faculty of Science, Shinshu University, Asahi 3-1-1, Matsumoto, Nagano 390-8621
2）長野県松本市旭 3-1-1　信州大学山岳科学研究所
Institute of Mountain Science, Shinshu University, Asahi 3-1-1, Matsumoto, Nagano 390-8621

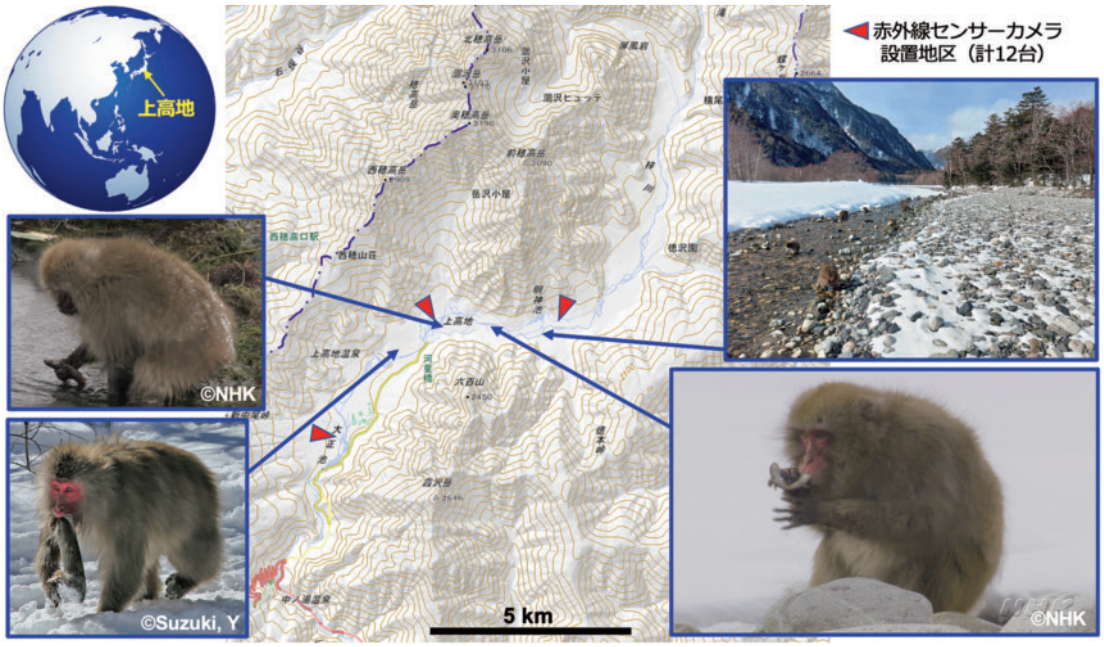


図 1：上高地でのニホンザル調査・研究サイトと撮影された水生昆虫食・魚食の画像.

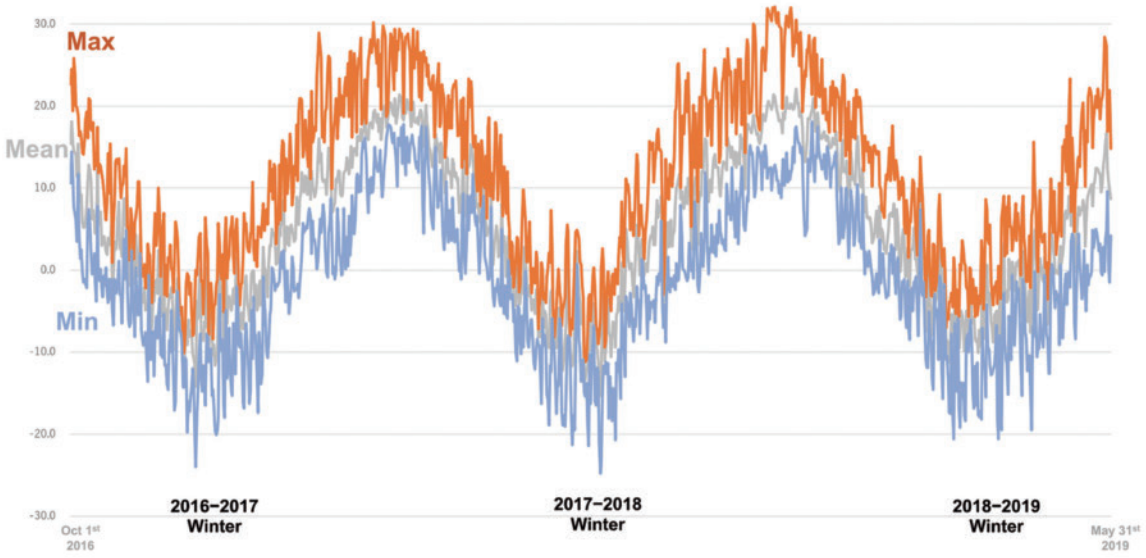


図 2：上高地（明神地区）における冬季 3 シーズンを含む気温変化（2016 年 10 月 1 日から 2019 年 5 月 31 日）．毎日の最高気温・最低気温・平均気温のグラフ（信州山の環境科学センターによる計測データ）.

1．はじめに

ヒト *Homo sapiens* を除く霊長類（いわゆるサル類）は熱帯や亜熱帯を分布の中心とする．多くのサル類は低温環境にはほとんど生息しておらず，本州中北部に生息するニホンザル *Macaca fuscata* は例外的な存在であり，下北半島に生息するニホンザル集団が「北限のサル」とされる．ただし，中部山岳の高山帯（夏季）や亜高山帯に生息するニホンザル集団の方が，下北半島をはじめとする東北地方の北部集団よりも，より低い気温の環境下で生息している．すなわち，上高地や志賀高原の亜高山帯で越冬しているニホンザル集団が世界最寒地に生息するサル類となる．サル類の分布域や集団サイズを規定するものとして「越冬戦略」は最重要事項であり，越冬できるか否かは集団維持の可否に直接関与する．

本研究で注目する上高地は，厳冬季には気温が－20℃を下回り，年によっては－25℃を下回る（図 1，2）．上高地の玄関口とされる釜トンネルよりも標高の高い地域

に，現在，約 200 頭のニホンザルが生息しており，4 群が形成されている．冬季の上高地はほぼ全面が雪に覆われ，厳しい餌不足となる．槍ヶ岳山麓（標高約 2,600 m）の槍沢を源流とし，上高地を貫流する梓川は，冬季の水位低下により横尾地区から明神地区までの流程に沿った約 10 km 弱がほぼ伏流し，本流の河原は雪原状態となる．ただし，梓川に流入する支流のうち，湧水が占める割合が大きく水量が豊富な支流などでは表流水もみられる．また，明神地区から大正池にかけての約 10 km の流程では，冬季にも表流水が確認されるが，その流量は極めて減少しており，本流であっても浅く緩やかな流れとなる．これらの表流水の流域は冬季の上高地において数少ない雪に覆われていない環境となる．このような上高地で越冬するニホンザルによる，凍らない河川環境における採餌行動は，彼らの越冬戦略の重要な特徴といえる．

このような背景下，ここ数年の上高地のニホンザル集団を対象とした調査・研究により，梓川の水生生物に依存した興味深い越冬戦略が明らかとなってきた．本稿では，一連の調査・研究に関する着想や研究の展開過程を紹介するとともに，これまでに明らかとなった成果について，我々自身の既報の 2 つの論文を引用しながら総説する．

2. 上高地のニホンザルにおける糞内 DNA のメタバーコーディング

2.1 糞内 DNA のメタバーコーディング実行の経緯

著者らは 20 年近くに渡り，上高地地域での水生昆虫類に関する様々な調査・研究を実施してきた．その過程で，梓川の水位が低下する冬季に，ニホンザルが浅瀬の石礫をひっくり返して水生昆虫類を捕食する行動をしばしば観察してきた．当初，我々は「餌資源が乏しい冬季には水生昆虫類が有用なタンパク源なのだろう」といった程度の理解であり，「多くの研究者が，日本各地のニホンザル集団を対象とした調査・研究を展開してきたはずであり，こうした行動もよく知られているのだろう」と考えていた．

2017 年度からの 2 年間，英国バーミンガム大学の Milner 教授をはじめ，同教授の研究室の 2 名の博士研究員を，それぞれ特別招聘教授と特任助教として信州大学山岳科学研究所にユニット招聘し（Milner 教授の 10 カ月間の滞在は，学振「外国人研究者招聘事業（長期）」の支援による），上高地での陸水生態学の共同研究に着手し，冬季も含めて定期的な上高地調査を実施する機会を得た．この共同研究は，気候変動が危惧される状況下，世界の氷河地域の陸水生態系モニタリングの一環として，氷河や雪渓を水源とする表流水を主とする沢と，いったん地下浸透した湧出地下水を主とする沢との間における水生昆虫群集の差異や降雨・出水時の撹乱耐性などの比較調査を目的とするものであった（Milner et al., 2020; Windsor et al., 2021）．この調査から，上高地の地下水を起源とする細流では，水温が年間を通して 5－6℃に維持されていることや，降雨後の撹乱の程度は低く抑えられ，水生昆虫類の種多様性や現存量が大きなことが判明した（Milner et al., 2020）．

こうした調査・研究を展開する中，欧州の陸水生態学者である Milner 教授らにとって，上高地のニホンザルが冬季にも雪深い上高地にとどまることや，冬季の餌資源として水生昆虫を利用していることは大きな驚きであり，彼らが文献検索をして辿り着くような国際誌では，こうした行動は全く報じられていないとの指摘を受けた．我々も文献を検索してみたところ，確かに和文や英語の書籍などではニホンザルの水生昆虫類の摂食行動に触れた報文があるものの，海外の研究者の理解には及び難いものと思われた．しかしながら，ニホンザルによる水生昆虫食そのものは既に報告されており，論文化する上での新規性を訴えるためには新たな試行が必要であると考え，冬季におけるニホンザルの糞内 DNA をメタゲノム解析することとした．これにより，捕食対象種群の特定や水生昆虫類への依存の程度がある程度明らかになるものと期待された．

2.2 想定外であったサケ科魚類 DNA の検出

2017－2019 年にかけての冬季（1－4 月）の 3 シーズンに，ニホンザルの同一個体・同一時期の糞を重複して解析することを回避するため，採取する日や採取場所を大きく変えるなどして（同じ日に複数の糞便試料を採取する場合には，上流側・明神地区，下流側・大正池地区の約 10 km の流程内における可能な限り離れた地点から）糞便試料を採取し，冷凍保存した．これらの糞便試料のうち，2017 年の 5 試料，2018 年の 15 試料，2019 年の 18 試料，合計 38 試料について，糞内 DNA のメタゲノム解析を実施したところ，水生昆虫類の DNA 配列が少なくとも全 3 冬季にわたる 18 サンプルから検出された（Milner et al., 2021）．得られた DNA 配列のうち，相同性検索の結果や検出された DNA リード数を表 1 に示す．リファレンス配列との一致率が低い配列データについては結果から除外しているため，リファレンス配列が GenBank に登録されていないことで結果から除外されているケースも考えられる（すなわち，表 1 として示し

表 1：2017–2019 年の冬季に上高地で採取したニホンザルの糞便試料（全 38 サンプル）から検出された陸水域に生息する動物由来と考えられる DNA の相同性検索結果と検出されたリード数

Phylum 門	Class 綱	Order 目	Family 科	Genus 属 /species 種	% similarity	% coverage	検出リード数
Chordata 脊索動物門	Actinopterygii 条鰭綱	Salmoniformes サケ目	Salmonidae サケ科	*Salmo trutta* ブラウントラウト	100	100	2,745
Mollusca 軟体動物門	Gastropoda 腹足綱	Sorbeoconcha 吸腔目	Tateidae カワツボ科	*Potamopyrgus antipodarum* コモチカワツボ	99.7	100	16,103
			Semisulcospiridae カワニナ科	*Semisulcospira dolorosa* キタノカワニナ	100	100	179
Arthiropoda 節足動物門	Hexanauplia 六幼生綱	Cyclopoida キクロプス目	Cyclopidae ケンミジンコ科	*Mesocyclops leuckarti*	99.7	100	6,842
	Insecta (Hexapoda) 昆虫綱（六脚綱）	Plecoptera カワゲラ目	Nemouridae オナシカワゲラ科	*Nemoura fulva* オナシカワゲラ	98.7	100	6
			Chloroperlidae ミドリカワゲラ科	*Sweltsa* sp. セスジミドリカワゲラ属の一種	90.6	100	61
		Diptera 双翅（ハエ）目	Tipulidae ガガンボ科	*Tipula* sp. ガガンボ属の一種	94.9	100	440
			Dixidae ホソカ科	*Dixa* sp. ホソカ属の一種	90.4	100	6
			Chironomidae ユスリカ科	*Conchapelopia* sp. ヒメユスリカ属の一種	93.2	100	203
			Chironomidae ユスリカ科	Gen. sp. ユスリカ科の一種	87.5	100	2,547

た結果は，餌動物相を過小評価している可能性がある）．

この結果，カワゲラ目 Plecoptera や双翅（ハエ）目 Diptera 昆虫類が多く検出され，中でもミドリカワゲラ科 Chloroperlidae やユスリカ科 Chironomidae，ガガンボ科 Tipulidae の昆虫類は DNA リード数としても多く検出された．この他の節足動物として，甲殻類のケンミジンコ *Mesocyclops leuckarti* の DNA リード数も多く検出されたが，体サイズが小さいことから，水草などを摂食する際に付随して摂食された可能性や，後述するような餌として捕食した魚類の胃内容物由来である可能性も考えられる．このような水生昆虫類などの DNA がニホンザルの糞内から検出されることは想定していたものの，38 糞のうちの 7 サンプルから（2 割近い糞サンプルから）サケ科 Salmonidae 魚類の DNA が検出されたことは驚きであった．他に，水生巻貝類 2 種の DNA も 9 サンプルから検出されており，うち 1 種は最多の DNA リード数であった．以上のことから，冬季・上高地のニホンザルは，多様な陸水域の生物を餌資源として利用している可能性が示唆された．

ここでサケ科魚類として扱った DNA 配列は，実際の DNA バーコード領域（ミトコンドリア DNA COI 領域）の配列として相同性検索した場合，ブラウントラウト *Salmo trutta* の登録配列と 100%一致した．本来，上高地地域に自然分布するサケ科魚類はイワナ *Salvelinus leucomaenis* であるが，約 100 年前（大正後期から昭和初期）に長野県が移殖放流事業としてブラウントラウトやカワマス *Salvelinus fontinalis*，ヒメマス *Oncorhynchus nerka*，ヤマメ *Oncorhynchus masou* の養殖・放流を上高地・明神地区で展開した経緯がある（坂田，1973）．この後，1939 年には，地元の漁業組合が明神地区の養魚場と放流事業を長野県から引き継ぎ，結果として上高地にはブラウントラウトとカワマスが定着し，イワナとの交雑が進んでいる．本研究でニホンザルの調査研究の対象とする上高地地域では，イワナ，ブラウントラウト，カワマス 3 種の交雑系統が生息しているような状況にあり，母系遺伝するミトコンドリア DNA 配列データだけで，いずれかの種と識別することは不可能な状況である．このような種識別の問題はあるにせよ，上高地のニホンザルがこれらの交雑個体を捕食している可能性が強く示唆されることとなった．

3. イワナ類を咥え，食べるニホンザルの写真提供

上高地のニホンザルの糞内からサケ科魚類の DNA が検出されたことを受け，2021 年 11 月末に，魚食の可能性を示唆した論文を英誌 Scientific Reports に公表したところ（Milner et al., 2021），国内外の多くのメディアに報道いただけた．これらの報道に触れた写真家の後藤昌美氏（北海道）と鈴木裕子氏（埼玉県）から，「2019 年 1 月 4 日の上高地で，ニホンザルが大きなイワナを咥えて歩き，その後に雪上に座り込んで食べる姿を撮影してい

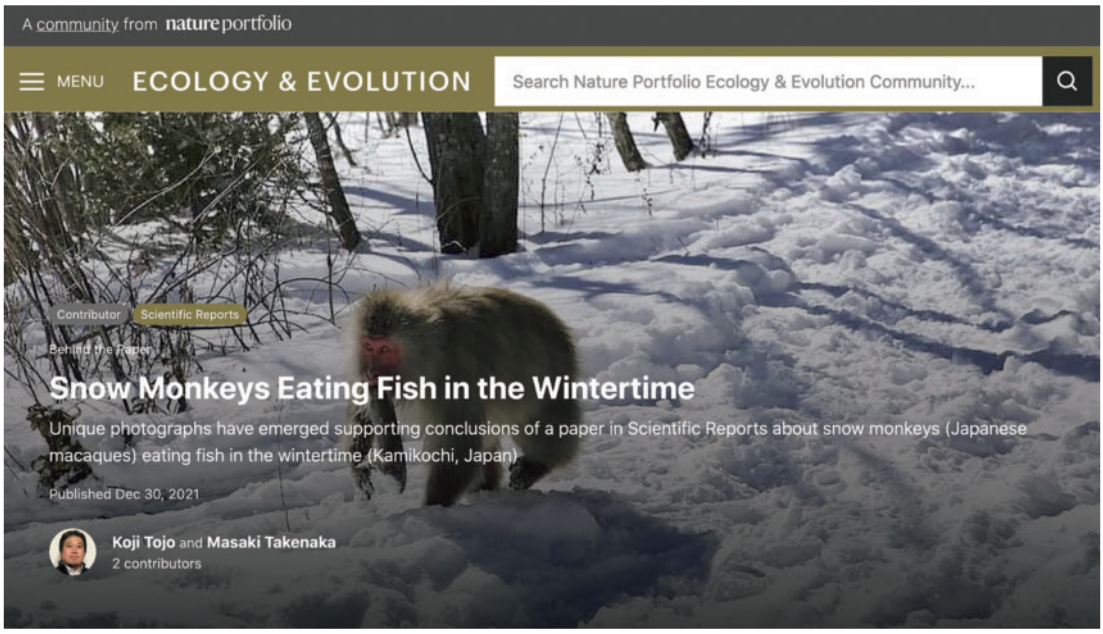


図 3：冬季・上高地のニホンザルにおける魚食行動進化の可能性を報じた論文（Milner et al., 2021）に関する Nature Portfolio, Ecology & Evolution でのオンライン記事.

た」とする情報が信州大学に寄せられ，その際の写真の提供を受けた．これらの一連の写真は大きなインパクトがあり，Scientific Reports を出版する Nature Portfolio のオンライン・サイト Ecology & Evolution において，先の論文執筆の関連記事としての執筆を勧めていただいた（図 3，Tojo and Takenaka, 2022a）.

4. イワナ類を獲える瞬間の動画撮影

後藤・鈴木両氏により撮影された写真から，上高地のニホンザルがイワナ類を食べていることは明らかとなったものの，この段階では，活きたイワナ類を捕獲したのか？　あるいは水位の低下などにより瀕死となったような個体や死体を捕獲したのか？　については依然として判断がつかない状況であった．写真の画像からは，捕食されているイワナ類から血液が垂れ落ちている状況や，胸鰭がピンと張っていたり，魚体が柔らかそうに見えるなど，長く冷凍状態にあったり死後硬直しているようには見えなかった（Tojo and Takenaka, 2022a）．また，2 シーズンに渡って採取した 7/38 の糞試料からサケ科魚類の DNA が検出されたことからも，偶発的な魚食というよりは恒常的に魚食をしている可能性が高いものと予想していた．何より，冬季の上高地を歩いてきた経験から，活きたイワナ類は頻繁に観察されるものの，死体や瀕死の個体を見かけたことは一度もなく，そうした個体を捕食している可能性は低いと考えていた．しかしながら，上高地のニホンザルが活きた魚類を捕獲する瞬間が目撃されたことはなく，直接的な証拠は皆無であった.

4.1 NHK との共同研究：イワナ類を獲える瞬間の動画撮影に成功

このような状況下，NHK の自然系番組「ダーウィンが来た！」の撮影クルー（代表・林浩介ディレクター）との共同研究がスタートし，2022 年 1 月から 3 月にかけて，上高地でのニホンザルの行動・生態調査・撮影が実施された（Tojo and Takenaka, 2022b）．約 2 週間弱の密着撮影，および 12 台の赤外線センサーカメラを 1 −3 月に長期設置することでの撮影に挑んだ．撮影場所やセンサーカメラの設置箇所は図 1 に示した通りである（Takenaka et al., 2022）.

上高地内のニホンザル集団は 4 群に分かれて行動しているとされるが（信州大学山岳科学研究拠点・泉山茂之氏私信），このうちの 3 群を日によって代えながら追跡した．冬季の上高地のニホンザルは，基本的には梓川本流や，湧水起源の支流周辺で過ごすことが多く，センサーカメラにも多くの動画が記録された．そして遂に，活きたイワナ類を捕獲する瞬間の動画撮影に成功した．カメラマンによる直接撮影が 6 回，センサーカメラによる撮影が 8 回（表 2），合計 14 回の魚食行動を動画として記録することができた（Takenaka et al., 2022）．さらに，これらの動画以外に，イワナ類とは同定できなかったものの，捕獲の場所や状況から，魚食行動であると推察さ

表 2：2022 年の冬季（1–3 月）の上高地に設置した赤外線センサーカメラの撮影画像の分析結果

カメラ	撮影開始	最終日	稼働日数	撮影終了理由	センサー起動数	サル映り	魚探索サル撮影数	魚捕獲挑戦回数	魚捕食回数	水中を物色	河道歩行	河道座位	飲水	その他
岳沢①	1 月 31 日	3 月 19 日	48	カメラ回収のため 3/23	169	56	1	0	0	32	26	0	0	9
岳沢②	1 月 31 日	3 月 4 日	33	カメラ回収のため 3/23	63	46	7	1	0	41	25	0	1	3
焼岳①	1 月 30 日	2 月 16 日	18	雪埋，データ量飽和	382	118	8	0	0	78	82	12	0	38
焼岳②	2 月　1 日	2 月 24 日	24	カメラズレ，雪埋，データ量	148	133	46	18	1	97	77	14	0	10
焼岳③	2 月 20 日	2 月 24 日	5	データ量飽和(データ破損？)	432	181	175	100	4	214	71	32	0	89
焼岳④	1 月 31 日	2 月 23 日	24	データ量飽和	158	149	7	1	0	102	114	25	0	57
焼岳⑤	2 月　1 日	2 月 24 日	24	データ量飽和	155	122	27	16	1	66	109	56	1	28
明神①	1 月 31 日	2 月 21 日	22	雪埋，カメラ回収 3/23	269	118	51	30	2	11	33	0	1	90
明神②	2 月　1 日	2 月 21 日	21	データ量飽和	156	95	24	4	0	45	42	0	3	49
明神③	1 月 30 日	2 月　1 日	5	データ量飽和	161	0	0	0	0	0	0	0	0	0
明神④	1 月 31 日	3 月 21 日	50	データ量飽和	133	104	3	1	0	36	42	2	4	81
明神⑤	1 月 31 日	2 月　4 日	5	データ量飽和	158	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合　計					2,384	1,122	349	171	8	722	621	141	10	454

れる動画が 6 回撮影されていた（表 2；Takenaka et al., 2022）.

4.2　赤外線センサーカメラにより撮影された動画の分析

表 2 に示したように，カメラマンによる密着撮影でも決定的な瞬間が捉えられたが，設置した 12 台のカメラのデータも極めて貴重である．梓川周辺での行動が多く撮影されたため，記録メディアのデータ容量が飽和することで撮影が終了となることが多く，中には設置から 5 日後には撮影が終了してしまったセンサーカメラも 3 台にのぼった．12 台のカメラ全体で，赤外線を感知した回数が 2,384 回，このうちニホンザルが撮影されていたのが 1,122 回で（他は，キツネやタヌキ，アナグマや登山者など），このうちイワナ類を探索するような行動がみられたのが 349 回，実際に捕獲を試みた行動は 171 回にもおよんだ．互いに離れた 3 地区（それぞれ異なる群れが行動している地域）にそれぞれ 2 −5 台ずつ設置したものの，いずれの地区（群れ）においても魚食行動が観察された．岳沢湿原地区におけるセンサーカメラの設置は 2 台だけであり，捕獲を試みた行動は 1 回だけ（捕獲できず）撮影されたような結果ではあったものの，この地区ではカメラマンが魚食行動を 2 回撮影している．また，観察対象とした 3 群の全てにおいて魚食行動が観察され，同じ群内でも異なる個体が魚食していることも明らかとなった．

次に，イワナ類の捕獲が確認された 14 回の動画が撮影された日時データから，当時の気象条件についての分析を実施したところ，時間帯や気候条件には特段の傾向はみられなかった．小雪が舞う程度の降雪日における魚食行動も観察された（Takenaka et al., 2022）.

以上の結果から，少なくとも 3 群に属する上高地のニホンザルの複数個体において魚食行動が確認されたこととなり，当初の予想通りに，恒常的に魚食行動が生じていることが明らかとなった．

5. 上高地のニホンザルにおける魚食行動の進化

上高地をはじめとする中部山岳域や本州東北部の山岳域では，雪深いニホンザルの生息地域も多く存在している．では，こういった地域集団でも魚食行動は進化しているのだろうか？　少なくともこれまでに魚食行動の報告は皆無（脚注）であることから，その可能性は低いように思われる．上高地同様に中部山岳域の亜高山帯に生息し，温泉に浸かるというユニークな行動を進化させた集団として，志賀高原（渋温泉・地獄谷）のニホンザルは世界的にもよく知られている．この周辺地域にもイワナが生息する渓流は多々みられるものの，魚食行動は知られていない．冬季にはゲートが閉鎖され，ごく一部の冬山登山者だけが入り込む上高地とは異なり，人間の居住地が近く，スキー場や温泉などのリゾートも近接するだけに，志賀高原の集団に魚食行動が進化していたとすれば，何らかの目撃事例があっても良さそうである．そもそも志賀高原では，魚食行動自体が生じていないと考えられる．

では，どうして上高地の集団内に魚食行動が生じ，進化したのであろうか？　我々は，極めてユニークな上高地の地史が影響しているものと考えている．焼岳火山群の活動により，火山噴出物が梓川の流路を堰き止めたこ

とで大正池が作られたことはよく知られているが，現在の大正池が形成されるよりも古い時代に，より巨大な堰き止め湖が形成されていたことが知られている（原山・山本，2014）．この湖底に周囲の 2,500 m 超の山岳域から運搬された大量の礫が平たく堆積し，梓川の流路に沿って横尾地区から大正池までの約 15 km もの平坦地がつづくような地形が形成されたとされる．こうした大規模な平坦地形をもつ渓谷は，国内では他に類をみない．また，緩やかな勾配の中を流下する梓川は，出水のたびに流路が変化するとともに，網状流が発達するため，小さな分流が随所に形成され，そうした分流部にもイワナ類が高密度で生息している．特に，晩秋の繁殖期にはこうした細流が繁殖場所となるため，比較的浅く小さな流れにも大型のイワナ類がたまるような状況が生じやすい．加えて，地下水の湧出も豊富であり，表流水に比べると水温が高く維持されることから，小さく緩い流れであっても氷結することもなく，こうした湧水流にはイチョウバイカモ *Ranunculus nipponicus* var. *nipponicus* などの水生植物が生育している．こうした条件が揃うような環境は上高地独特の特徴と言える．実際に，上高地のニホンザルは，冬季にこれらの小さな分水流の中で水生植物をよく摂食しており，これらの植物体に付着した水生昆虫類を摘んで食べる姿も時折観察される（Takenaka et al., 2022, Supplementary Video 5）．こうした摂食行動を進化させてきた延長上で水生昆虫食が定着し，水生植物や枯枝，さらには石礫などを持ち上げることでそれらに付着した水生昆虫類を捕食するような行動が進化し，やがては緩く浅い瀬で石礫をひっくり返すような行動へと発展していったのではないかと推察する．そして，このような石礫おこしをしながら水生昆虫を摂食している行動の最中に，驚いたイワナ類が跳ねるような場面も観察されている．こうした水音にニホンザルが敏感に反応し，以降はイワナ類を探索するような行動へと切り替わる様子も観察された（Takenaka et al., 2022, Supplementary Video 1–4）．すなわち，上高地のニホンザルの魚食行動が進化した背景には，その前適応として，水生植物食や水生昆虫食があり，これらの前適応が生じ得るような好適な条件が上高地には揃っていたと考えられる（Takenaka et al., 2022）．

脚注：科学的な文献ではないが，信州・伊那地域の民俗学的出版物である「続・狩りの語部：伊那の山峡より」（松山，1977）の中で，著者が地元の猟師から伝え聞いた話として「サルの川干し」が記されている．サルが群れで礫を転がして川の流れを変え，水量が減った（干上がった）川で魚を捕獲していたとの伝承が記されている．文章化されたニホンザルの魚食に関する唯一の出版物であるかもしれない．

参考文献

原山　智，山本　明（2014）「槍・穂高」名峰誕生のミステリー 地質探偵ハラヤマ出動．山と渓谷社，東京．352pp.

松山義雄（1977）続 狩りの語部：伊那の山峡より．法政大学出版局，東京．

Milner A.M., C. L. Docherty, F. M. Windsor, and K. Tojo (2021) Macroinvertebrate communities in streams with contrasting water sources in the Japanese Alps. *Ecology & Evolution*, **10**, 7812–7825.

Milner A. M., S. Wood, C. Docherty, L. Biessy, M. Takenaka, and K. Tojo (2021) Freshwater biota in the wintertime diet of Japanese macaques from Chubu Sangaku National Park, Japan. *Scientific Reports*, **11**, 23091

坂田　尚（1973）上高地のイワナ．大町山岳博物館（編）北アルプス博物誌 III 動物・自然保護（大町山岳博物館編）：178–182．信濃路，東京．

Takenaka M., K. Hayashi, G. Yamada, T. Ogura, M. Ito, A. M. Milner, and K. Tojo. (2022) Behavior of snow monkeys hunting fish to survive winter. *Scientific Reports*, **12**, 20324.

Tojo K. and M. Takenaka (2022a) Snow monkeys eating fish in the wintertime: Unique photographs have emerged supporting conclusions of a paper in Scientific Reports about snow monkeys (Japanese macaques) eating fish in the wintertime (Kamikochi, Japan). Nature Portfolio. URL https://ecoevocommunity.nature. com/posts/snow-monkeys-eating-fish-in-the-wintertime? fbclid =IwAR1RwXulUpzThOj0xYFt16r5qJxCWXnWiIVhscj1Z5HXUA1GKnYMzCUL–0（2022.12.4 閲覧確認）

Tojo K. and M. Takenaka (2022b) The world's first ever filming of snow monkeys fishing: Publication of an image analyses paper on their fishing behavior. Nature Portfolio. URL https: //ecoevocommunity. nature. com/posts/the-world-s-first-ever-filming-of-snow-monkeys-fishing-publication-of-an-image-analyses-paper-on-their-fishing-behavior? fbclid =IwAR1C0sS727WNSqB5AlDGQfv0VRmdANBu9UINxOuhYpTGaAEaGlKggigTD2g（2022.12.4 閲覧確認）

Windsor F. M., C. L. Docherty, N. Brekenfeld, K. Tojo, S. Krause, and A. M. Milner (2021) Hydrological, physicochemical and metabolic signatures in groundwater and snowmelt streams in the Japanese Alps. *Journal of Hydrology*, **600**, 126560.

■紀要「低温科学」の変遷

・低温科學，第 1 輯（1944 年）– 第 10 輯（1953 年）
・低温科學．生物篇，第 11 輯（1954 年）– 第 35 輯（1978 年）
・低温科学．物理篇，第 11 輯（1953 年）– 第 53 輯（1995 年）
・低温科学．物理篇．資料集，第 27 輯（1970 年）– 第 63 輯（2005 年）
（このうち，第 1 輯（1944 年 12 月）～第 3 輯（1950 年 12 月）は岩波書店発行，第 4 輯（1948 年 10 月）は北方出版社発行，第 5 輯（1950 年 12 月）以降は低温科学研究所発行）
・低温科学．第 64 巻（2005 年）～
※第 68 巻（2009 年）Supplement Issue（英文増刊号発行）

■著作権

・本紀要に掲載された論文の著作権は，北海道大学低温科学研究所に属する．
・ただし，原著者が出典を明示して再利用することは妨げない．
・また，掲載論文の一部または全部を電子的に蓄積し，北海道大学低温科学研究所が行う情報提供サービスにより公開することがある．

2023 年 3 月 20 日

発　行　者　北海道大学　低温科学研究所
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
URL：http://www.lowtem.hokudai.ac.jp

編　集　者　山口　良文

印刷・製本　㈱アイワード

© 2022 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

ILTS

北海道大学 低温科学研究所

Institute of Low Temperature Science,
Hokkaido University, Sapporo, Japan
http://www.lowtem.hokudai.ac.jp