

新潟大学大学院 自然科学研究科
令和3年度 博士後期課程 学位論文

論文目録	冬眠の代謝調節機構の解明を目指したシマリスの冬眠における代謝調節因子 AMPK の機能に関する研究
------	---

専攻	環境科学
コース	流域環境学
在籍番号	F14N009J
氏名	山田 新太郎

目次

	1章. 緒言	・・・1
5	1-1. 哺乳類における冬眠	
	1-2. 冬眠における低体温と低代謝	
	1-3. 冬眠における代謝調節に関わる分子の探索	
	1-4. 代謝調節因子 AMPK の生理的な機能	
	1-5. 冬眠における AMPK	
10	1-6. 冬眠の代謝調節における AMPK の機能を明らかにするためのアプローチ	
	1-7. 冬眠研究におけるシマリスの有用性	
	1-8. 本研究の目的	
	2章. シマリスの各組織における AMPK シグナル系の活動期と冬眠期の比較・・・15	
	2-1. はじめに	
15	2-2. 方法	
	2-3. 結果	
	2-4. 考察	
	3 章. 冬眠様式の多型間に見られる季節的な AMPK シグナル調節系の違い	・・・26
20	3-1. はじめに	
	3-2. 方法	
	3-3. 結果	
	3-4. 考察	
	4 章. 冬眠シマリスの脳における AMPK 活性の冬眠前調節の評価と冬眠における AMPK 活性化の意義	・・・39
25	4-1. はじめに	
	4-2. 方法	
	4-3. 結果	
	4-4. 考察	
30	5 章. 総合考察	・・・52
	謝辞	・・・55
	参考・引用文献	・・・56
35		

1 章 緒言

1-1. 哺乳類における冬眠

- 40 現在、地球上のあらゆる環境には様々な生物が広く分布しており、その分布拡大においては、体温調節機能の進化が大きく貢献してきたと言われている。温度はあらゆる化学反応を促進するのに重要な要素であり、化学反応が基となる様々な酵素反応を生存の要とする生物にとって、一定の温度下で体温を維持するための仕組みは様々な環境に適応するために非常に重要であると考えられている (Clarke and Pörter 2010)。恒温動物である哺乳類や鳥類
- 45 が獲得してきた、安定的に 40°C前後に体温を維持する仕組みは、気温が低い夜間環境を始めとし、寒冷環境を含む広い温度域でニッチを広げるために獲得されてきた非常に重要な形質であると言われている (Clarke and Pörter 2010)。哺乳類の体温調節は、体の細胞や組織で行われている様々な代謝活動によって生じる熱と、熱を体外へ放散することのバランスを取ることで行われている。一般的に、恒温動物である哺乳類が体温を保つために重要である
- 50 熱は、細胞や組織における様々な代謝活動の結果である基礎代謝によって賄われている。哺乳類では、体温を高く保つために、他の変温動物と比べ、高い基礎代謝率を維持するように進化してきていることが知られており、その分、外環境の変化に強く、活動圏が広い。その一方で、外部から取り入れる熱量が変温動物と呼ばれるような種に比べて多量に必要であるため、取り入れることができるエネルギーに変動が大きい冬期や乾期などの季節へ適応
- 55 してこなければならなかった (Geiser et al. 2017)。その結果として、哺乳類の一部では、体温や代謝をその時々エネルギー状態に合わせてうまく調節する能力を持つ“異温性”という形質を持つよう進化してきた (Clarke and Pörter 2010)。その中でも、特にエネルギー供給の厳しい長い冬期をやり過ごすために、長期に渡り代謝を下げ、低体温状態に体を調節する形質は“冬眠”と呼ばれている。
- 60 北方にも広く分布を広げてきた哺乳類では、生存の厳しい冬期の寒冷環境に適応するため、

冬でも体を維持するエネルギーを獲得するために活動し続ける、あるいは活動せずにエネルギーの消費をなるべく抑えるかのどちらかの選択がなされてきた。冬眠は、後者が選択された結果として、一部の哺乳類が獲得してきた形質であり、生存に過酷な冬を、体温や代謝を著しく低下させ、やり過ごすための適応的な生理現象であると考えられている（川道
65 2000）。これまでに、冬眠を行う哺乳類は、カモノハシ目、カンガルー目、モグラ目、コウモリ目、サル目、ネズミ目、ネコ目の7目における183種でみられ、これは全哺乳類4070種のおよそ5%に相当することが報告されている(川道 ほか 2000)。また、冬眠と同様に体温を下げ、一時的なエネルギー抑制を行う日内休眠を行う種を含めるとさらに休眠を行う種は増えることから、冬眠などの能動的に体温や代謝を抑制し、その場のエネルギー飢餓を
70 やり過ごす現象は、哺乳類が様々な環境に分布を広げる過程において重要な形質であったと考えられる(Turbill et al. 2011)。一般的に恒温動物である哺乳類の体温は、通常37~40°C前後に保たれており、体温の著しい低下は、自律的な体温調節を不可能にし、最後には死に至ってしまう。しかし、シマリスやジリスなどの小型の冬眠動物は、冬眠を行うことで、体温が0°C付近まで低下しても体に障害が残ることなく元の体温へ復帰することができる（川道
75 ほか 2000）。そのような著しい体温および代謝変化に耐えるために、哺乳類の体は様々なストレスへの耐性を獲得していると言われ、低体温、低代謝耐性だけにとどまらず、低酸素状態への耐性や虚血耐性、発がん性耐性、放射線耐性などが報告されており、また、それらの様々なストレス耐性の結果、一般的な哺乳類と比べ、冬眠動物は寿命が比較的長いことも報告されている(Mohr et al. 1973, Sharapov 1984, Frerich et al. 1998, Puspitasari et al. 2021)。これ
80 らのことから、冬眠という現象は、哺乳類の進化的・生態学的な観点だけではなく、医療的な観点でも非常に興味深い研究対照とされ多くの研究がなされてきた。しかし、未だに冬眠のメカニズムには謎が多く、どのようにしてその極度の低体温、低代謝状態が作り出されているのか明らかになっていない。

85 1-2. 冬眠における低体温と低代謝

冬眠中の冬眠動物では、体温は外気温と同程度まで低下し、当然ながら代謝も同様に活動している時と比べ著しく低下する。冬眠における低体温・低代謝状態は、数日続いた後に冬眠動物は自発的な産熱を行い、元の温度まで体温を上昇させる中途覚醒を行う (Buck and Barnes 2000, Storey et al. 2010)。中途覚醒によって体温を上昇させた冬眠動物は、1日ほどで体温を再び低下させ、冬眠に入る。冬眠動物は冬眠期の間、これらの一連の過程を持続的に続けることが知られている。これらのことから、冬眠動物は、冬眠を行うために、体内の様々な代謝機能をコントロールすることで、体温や代謝を調節していることが考えられている (Storey et al. 2010)。体温は代謝によって発生した熱により維持されていることから、冬眠時における通常体温から低体温への移行に際し、体の様々な代謝が同様に著しく抑制される。例として、冬眠しているシベリアシマリス *Tamias sibiricus* では、代謝速度 (cal/g/min) が活動している時の 1%程度まで低下し、エネルギー消費量が 13%程になることが報告されている (川道ほか 2000)。また、冬眠時の代謝率の低下は、同じく冬眠動物であるオオヤマネ *Glis glis* や、シマリスよりも高い体温で冬眠を行うアメリカクロクマ *Ursus americanus* を始めとした様々な哺乳類でも報告されている (Tøien et al. 2011, Storey et al. 2010)。体内で行われる代謝は様々な酵素反応による化学的な過程を介して起こるため、体温の影響も強く受ける。例えば、体温が 37°C前後に保たれている人において、体温が 1°C低下するごとに代謝は 10~20%ほど低下すると言われている。そのことから、冬眠中の代謝の低下は、冬眠による体温低下の影響を強く受けることが想定される。したがって、冬眠のメカニズムの解明には、冬眠時にどのように代謝の抑制が調節されているかを明らかにすることが重要であると考えられる。しかし、この冬眠における体温、代謝の調節がどのように行われているかは、わかっていないことが多い。

1-3. 冬眠における代謝調節に関わる分子の探索

110 冬眠における代謝調節のメカニズムを明らかにしようと、細胞から組織、さらには個体レベルに渡り、様々なスケールで研究が行われてきた。特に、近年の分子的な実験手法の発達により、細胞や組織内において、冬眠に関わる様々な遺伝子やタンパク質を標的とした研究がなされてきた。Storey ら(2004)は、哺乳類の冬眠において、広く保存されている代謝の分子

115 的な制御機構として、(1)タンパク質の可逆的なリン酸化を利用して、主要なエネルギー産生経路およびエネルギー消費経路を抑制し、必要なエネルギー状態に合った ATP のターンオーバーを調節すること、(2)転写や翻訳が抑制される一方で、特定の遺伝子が選択的にアップレギュレーションされること、(3)環境条件により通常の生活に迅速に戻る事ができるように高分子を保護し、安定化させることの3つを挙げている。Storey ら (2004) が挙げ

120 ているように、各組織における細胞膜の Na⁺-K⁺ATPase などの膜貫通型タンパク質の機能の抑制や、開始・翻訳などのタンパク質合成に関わる経路が、eIF2 α や eEF2 を始めとしたシグナル伝達因子の機能の抑制など、生存に重要な細胞の機能の多くが冬眠時において可逆的なリン酸化によって抑制されることが知られている(Frerich et al. 1998)。また、近年発達してきた遺伝子の網羅的な発現解析によって、冬眠による低体温に併せて、様々な遺伝子が冬眠する時期になると上方調節または下方調節されることがわかってきている(Grabek et al.

125 2015, Schwartz et al. 2013)。しかし、これまでに活動期から冬眠期にかけて変化する多くの代謝調節に関わる遺伝子やタンパク質などの分子が報告されてきているものの、細胞や組織内における代謝調節に関わる様々な因子の翻訳後修飾の変化や、特定の遺伝子の発現の変化が、どのように冬眠の低体温・低代謝の誘導に結びついているかはわかっていない。

細胞内や組織内における冬眠の代謝調節に関わる分子の探索が進むのと同様、個体レベル

130 においても冬眠の代謝調節に関わる中枢機能や、体全体の低代謝を誘導する機構の研究が、薬理的な方法や最新の遺伝学を応用した技術によって進められてきた。低体温、低代謝を作り出せる薬理作用を持つとされる N6 cyclehexyladenosine(CHA)は Adenocine A1 Receptor へ

のアゴニスト作用を持ち、マウスやラットの中枢組織への投与により非冬眠動物においても冬眠様な低代謝・低体温状態を作り出すことができることが報告されている(Tupone et al. 135 2013)。この CHA を冬眠動物であるジリスの脳内へ投与する実験において、冬眠における体温の低下が哺乳類の体温調節に関わる視床下部の視索前野周辺の神経核や、脳幹における縫線核を介して起きる可能性がしめされてきている(Olson et al. 2013, Frare et al. 2019)。また、Takahashi ら(2020)は、摂食調節に関わる Pyroglutamylated RFamide Peptide (QRFP)を分泌するニューロンを活性化させると低体温や低代謝をマウスに誘導できることから、このニュー 140 ーロンを Quiescence-inducing neurons(Q ニューロン)と名付け、Q ニューロンを Chemogenetic な手法を用いて活性化することにより、マウスの休眠を誘導することに成功し、さらに冬眠や休眠を行わない非冬眠動物であるラットにおいても Q ニューロンを活性化することで障害を伴わない低体温を誘導することに成功した。さらに、近藤ら(1992)は、シマリスにおいて冬眠を調節する物質として冬眠特異的タンパク質 HP を同定しており、脳内 HP の活性を 145 阻害することで冬眠を抑制できることから、冬眠の中枢が脳に存在することを示唆している(Kondo et al. 2006)。これらのことから、冬眠や休眠に必要な体温・代謝調節を行う中枢が脳に存在し、間脳や視床下部、延髄などの体温調節中枢を介して、冬眠における体全体の体温・代謝調節が行われていると推察される。しかし現在までに、脳内においてどのような分子が冬眠を誘導するために働き、冬眠に必要な低体温・低代謝シグナルが神経を介して体全 150 体に伝達されているのかはわかっていない。

以上から、冬眠の体温・代謝調節に関わる分子的なメカニズムを明らかにするためには、代謝調節を担う中心的な分子に着目し、冬眠する時にその因子がどのような組織でどのような変化をし、結果として、冬眠の低体温・低代謝に関わるのかを包括的に評価することも有効な手段といえる。冬眠における体温・代謝の低下は体の一部で部分的に生じているわけ 155 ではなく全身性の反応であることを踏まえると、全身の組織や細胞に存在する普遍的な因子であること、中枢において全身の代謝調節を担う因子などが冬眠調節の候補因子の一つ

としてあげられるかもしれない。

1-4. 代謝調節因子 AMPK の生理的な機能

160 体を維持するための代謝機構には様々な種類があり、その調節に関わる分子も多様に存在している。代謝調節に関わる分子の中でも、1種類のタンパク質で多くの代謝機能に関わるタンパク質を“シグナリングハブ”タンパク質といい、代謝調節に関わる分子の研究において特に着目されることが多い。全身の細胞に存在している AMP-activated protein kinase(AMPK)もそのようなタンパク質の一つであり、特にエネルギー代謝に関わる細胞内の代謝プロセスに重要な役割を担っている。AMPK は、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ のサブユニットがヘテロ三量体の構造を作ることで成り立つリン酸化酵素(キナーゼ)の一種で、無酸素状態やグルコースの欠乏、エネルギー消費による細胞内の AMP:ATP 比の上昇に反応して活性化するセリン/スレオニンキナーゼである (Hardie 2007, Ronnet et al. 2009)。このキナーゼは、細胞内のエネルギーが消費され、AMP が蓄積されてくると、 γ サブユニットの AMP 結合部位に AMP が結合し、 α サブユニットの Thr172 が上流のキナーゼによりリン酸化されることでアロステリックな活性化を受ける。活性化した AMPK は、エネルギー産生の促進と消費の抑制を導き、細胞内のエネルギーバランスを維持する働きを持つ。すなわち、AMPK は、細胞内のエネルギー飢餓状態で活性化し、エネルギーを節約させる状態に細胞内を整える機能タンパク質であり、そのことから、このタンパク質は、細胞内のエネルギーセンサーと呼ばれている (Kahn et al. 2005)。

165

170

175

一般的に、活性化した AMPK は、AMPK の下流のシグナル伝達系に属する様々なタンパク質を介して、細胞内のエネルギー状態を調節する。AMPK シグナル系の下流標的には、エネルギー消費を多く伴うタンパク質や脂肪酸、糖の合成などの同化経路に関わるタンパク質を始めとして、細胞の増殖や、オートファジー、ミトコンドリアの生合成など様々な細胞内の代謝過程に関わるタンパク質が存在している(Hardie 2007)。AMPK は、これらの様々なタ

180

ンパク質をリン酸化することで活性化もしくは抑制を引き起こし、それにより様々な代謝過程を調節し、細胞内のエネルギー状態を維持している。また、AMPK は、様々な下流因子の調節によるエネルギー消費の抑制を行う過程で、細胞内の活性酸素の抑制や異常な細胞、異常タンパク質の除去に関わっていることから、抗酸化作用や、虚血に対する抵抗性、細胞のガン化の抑制、長寿命などにも貢献しているとされ、エネルギー恒常性の維持だけにとどまらず、細胞や組織を健全に保つための機能を持つことも示されている(Kahn et al. 2005)。そのため AMPK は、医療科学的にも研究価値のあるタンパク質として知られており、肥満治療やがん治療、また寿命の延長、生活の質の改善などの薬理的な標的分子として、非常に注目されているタンパク質の一つでもある(Kahn et al. 2005, Burkewitz et al. 2014) 。さらに近年、AMPK が関わる代謝調節機能が細胞内や組織内だけにとどまらず、中枢神経系を介し体全体に作用していることが明らかとなってきている。例えば、飢餓による血糖値の低下や摂食に関わる Leptin、Adiponectin などのホルモン作用を受けることで、視床下部神経細胞内における AMPK 活性が変化し、摂食行動を促進することがわかってきている (Minokoshi et al. 2008)。また、視床下部の AMPK の活性化により、交感神経性の神経伝達が起こり、末梢の褐色脂肪組織における熱産生の調節が起こることで、AMPK が体温調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている(Minokoshi et al. 2008, Liu et al. 2020)。以上から、AMPK は、細胞内を始めとして、組織から個体レベルにおける様々なスケールで代謝調節に関わっているため、冬眠のような、体全体で代謝の動態が著しく変化するような生理現象の調節に関与している可能性が高いタンパク質であると考えられる。

200

1-5. 冬眠における AMPK

前節より、AMPK は細胞を始めとして、体内の代謝センサーとして働くことから、代謝や体温が著しく低下する冬眠にも関与していると考えられてきた。例えば、Horman ら(2005)は、冬眠中のジュウサンセンジリス *Spermophilus tridecemlineatus* の組織において、AMPK のシ

205 グナル系が活動期から冬眠期に活性が変化しているかを評価しており、冬眠している時の
ジュウサンセンジリスの肝臓では活動期と比較して AMPK 活性の低下がみられ、白色脂肪
組織では AMPK 活性の増加が報告されている(Horman et al. 2005)。また、Hearly ら(2011)は、
キンイロジリス *Callospermophilus lateralis* を用いて、ジリスが絶食している冬眠期において
各組織で起こる AMPK 活性の変化が、活動期において飢餓状態に曝された動物の体の組織
210 全体で起こる AMPK の活性化と同様の変化があるかを比較している。その結果として、活
動期における短期的な絶食では、ジリスの各組織における AMPK の活性は視床下部の弓状
核を除いて全体的に上昇していたのにくらべ、活動期から冬眠期における各組織の AMPK
の活性の変化は全体的に少なく、大きな AMPK 活性の変化が見られた組織は脂肪のみであ
ったことが報告されている。また、冬眠期において、中途覚醒時と低体温時の視床下部の弓
215 状核での AMPK の活性の比較により、中途覚醒時よりも低体温時に AMPK が活性化するこ
とがわかっている。これらの研究では、冬眠における AMPK の役割は、体全体で代謝を低
下させ低体温を作り出すことに作用しているのではなく、冬眠期における中途覚醒時に体
温を上げる際のエネルギーを作り出すことにあるのではないかと考えられている。一方、
Florant(2010)らは、冬眠期には絶食し、餌を食べない冬眠中のキバラマーモット *Marmota*
220 *flaviventris* の脳内に AMPK を活性化する 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
(AICAR)を投与することで、採餌を再開させ冬眠を阻害させたことから、脳内の摂食に関わ
る中枢と冬眠を誘導する中枢が共通で、その調節に AMPK が関与している可能性を述べて
いる。

以上から、冬眠と AMPK に関わる研究は多いとは言えないものの、冬眠の低代謝調節に
225 AMPK が関与している機能としては、抹消組織における AMPK は低代謝誘導には直接関与
をしていないと考えられるが、中枢組織である脳において、AMPK は摂食に関するような
遠心性神経を介した代謝・体温調節への関与が示唆されている。しかし、現在までに、脳に
おける AMPK の活性が活動期から冬眠期にかけてどのように変化しているか、またその活

性的変化が冬眠の低体温・低代謝の誘導にどのように結びついているのかなど、冬眠の代謝調節における AMPK の役割はわかっておらず、AMPK が冬眠の代謝調節に関わる分子であることを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

1-6. 冬眠の代謝調節における AMPK の機能を明らかにするためのアプローチ

それでは AMPK が冬眠の代謝調節系に関与していることを示すにはどのようなアプローチが必要となるだろうか？ これまでの様々な冬眠における研究でも、多く行われてきており、最も単純といっても良いアプローチとしては、活動期と冬眠期間での様々な因子や組織の比較があげられるだろう。このアプローチを用いてこれまでに多くの体内の遺伝子やタンパク質の発現、また組織などの機能が、前節の 1-3 などで挙げているように活動期と冬眠期で異なることが示されてきた。しかしながら、この活動期と冬眠期の間で検出された変化は、活動期と冬眠期における体温などの体内環境のバックグラウンドの違いの影響を受けており、冬眠の調節のもとでの分子や組織の変化の正確な評価であるとは言えない可能性があることが指摘されている(Grabak et al. 2015)。例えば、冬眠動物のジリスにおいて、タンパク質合成を行う過程の翻訳段階で重要な役割を持つ eEF2 は、脳組織や肝臓の組織で活動期と比較して冬眠期に抑制状態になり、タンパク質合成を抑制することが報告されている(Chen et al. 2001, Frerich et al. 1998)。しかし、非冬眠動物である人の腎臓由来の HEK293 細胞でも、低温に暴露することでジリスと同様 eEF2 が抑制され、その結果タンパク質合成の抑制が起こることが知られている (Knight et al. 2015)。このように、活動期と比較して冬眠期に起きている因子の変化が、冬眠のメカニズムによるものではなく、体温の低下の影響や、それに付随して起こる体内環境の変化により起きている可能性があり、冬眠のメカニズムの理解につながらない可能性が指摘されている。

そこで低体温などの影響を受けないアプローチ方として提唱されているのが、活動期と冬眠期の間の、季節で表すところの秋の段階の“冬眠移行期”に着目した比較である(Grabek

et al. 2015)。ジリスやシマリスなどの冬眠動物は、義務的な冬眠動物といわれており、活動期と冬眠期を内因性の概年的な周期性をもって調節していることが言われている。これら
255 の冬眠動物は、1年の中で明確に活動期と冬眠期が分かれており、春から秋の終わりまでは冬眠する能力が無いが、秋の終わりから冬の間は冬眠する能力をもつことが知られ、冬眠能力の有無が概年的なリズムで可塑的に変化することが知られている (Grabek et al. 2015)。また、これらの冬眠動物は、外環境の変化が無い実験室下でもこの冬眠の概年リズムを持っており、外環境の変化が無い環境でも明確に活動期と冬眠期をもつ。例えば、シマリスでは、
260 外環境の変化がない 5°C 恒暗条件下においても個体ごとに独自の冬眠リズムを内因的に持って
おり、活動期と冬眠期を明確に示すことが知られている(Kondo et al. 2006)。これらの義務的冬眠動物では、活動期には冬眠を行うことができないが、冬眠期の前かつ低体温になっていない状態の冬眠移行期において、内因的な冬眠調節のもとで冬眠するための体の準備が行われることが指摘されている。例えば、ジリスの心臓や褐色脂肪組織では、冬眠移行期
265 である秋において、脂肪酸結合タンパク質の遺伝子である FABP3 の発現量が活動期と比べて、冬眠期と近いレベルまで発現が上昇することが報告されている(Hindle and Martin 2014, Grabek et al. 2011)。またシマリスでは、23°C 条件での飼育下においても、冬眠の低体温を経験していなくても自律的な冬眠周期の元で、心臓が低体温に耐えられるように変化することが報告されている(Kondo and Shibata 1984)。したがって、これらの冬眠動物では、冬眠に
270 重要な変化は外環境や体温によらず、内因的な冬眠周期によって調節されることが示唆されて
おり、冬眠の調節のもとで働く冬眠に重要と考えられる因子を抽出するためには、体温や体内環境によって変化せず、冬眠調節系の下で変化するような因子を検出すれば良いと
考えられる。以上より AMPK が、冬眠の代謝調節に重要な機能を持つかを調べるためには、
活動期と比較して冬眠期に変化するかを検証するだけでなく、冬眠動物が持つ季節的な冬
275 眠調節のもとで AMPK が変化することを示す必要があると考えられる。

1-7. 冬眠研究におけるシマリスの有用性

一般的に、動物実験を行う際は、遺伝的なバックグラウンドが揃っており、遺伝子情報を始めとして、実験を行う上で様々な情報が揃っている動物種の実験動物の選択が望ましい。しかし、冬眠動物において、明確に冬眠のモデル動物として確立している種は存在していないため、冬眠の研究を行うにあたり、対照とする冬眠動物の選択は非常に重要である。冬眠する哺乳類は多数存在しているが、特に冬眠の研究が進んでいるのはリス科の冬眠動物といっても過言ではなく、冬眠の研究を遂行するためには適した分類群であるといえる。その中でもシマリスにおいては、冬眠特異的タンパク質 (Hibernation specific protein: HP) という、現在までに冬眠を調節する物質として唯一見つかっているタンパク質の研究が進んでおり、シマリスを実験動物として冬眠研究に用いることで様々な展開が期待できると考えられる。

シベリアシマリス *Tamias sibiricus*(以下、シマリス)は、比較的小型のリスであるシマリス属 *Tamias* に属しており、シマリス属全 25 種のうちで唯一北米ではなく、日本の北海道を含むアジア圏から東ヨーロッパ圏にかけて分布する冬眠動物である (川道ら 2000)。シマリスは、季節性の冬眠を行う義務的冬眠動物で、実験室条件下で 5°C に保った恒暗状態で長期に渡り飼育しても、冬眠は 1 年周期で規則正しく活動期と冬眠期を繰り返して行うことから、自律的な冬眠の年周リズムを持っているとされている(川道ら 2000, Kondo et al. 2006)。近藤らは、このシマリスの規則正しい冬眠周期と、シマリスの心臓が冬眠期に近くなると低体温に依存せずに冬眠プレコンディショニングな低温耐性を持つことから、内分泌による冬眠調節が起きていることを予測し、シマリスの血中から冬眠を調節するとされている冬眠特異的タンパク質(HP)を発見した(Kondo and Shibata 1984, Kondo and Kondo 1992)。HP は、HP-20、-25、-27 の C1q ファミリーに属する 3 つのタンパク質からなる 3 量体に、 α -アンチトリプシンに類似した HP55 が結合した 4 量体のタンパク質で、シマリスの肝臓でのみ特異的に産生され、産生された HP は血中に放出されることがわかっている(Kondo and Kondo 1992, Takamatsu et al. 1993)。5°C・恒暗条件下で飼育したシマリスの血漿中 HP 量を測定すること

で、その量は周期的に繰り返されるシマリスの冬眠と同調して変化することがわかり、活動期には血中に高濃度で存在しているが、冬眠期が近づくと徐々に減少し、冬眠期になると血中 HP は低濃度になることが明らかとなった(Kondo and Kondo 1992)。このような HP の生体内調節の知見から、HP は冬眠期が近づくと脈絡叢を通り脳内へ輸送されることがわかり、
305 HP 抗体の脳室内投与により阻害したところ、冬眠状態から覚醒状態への速やかな移行が見られたことで、HP がシマリスの冬眠調節に不可欠な生体内因子であることが明らかとなった (Kondo et al. 2006)。このことから、シマリスの冬眠は、季節的な年周期の下で HP の発現や生体内での挙動が調節され、冬眠する時期が近づくと脳内で HP が機能することで冬眠が誘導される。これまでに、冬眠を誘導する物質が見つかって来なかったため、このように
310 シマリスにおける HP が内因的な冬眠の年周リズムに基づいて生体内を移動することによって冬眠が引き起こされていることが明らかとなったことは、冬眠調節の研究において大きな一歩となったと考えられている。

以上から、シマリスでは、現在までに冬眠を誘導する唯一の因子である HP が見つかり、冬眠研究は、シマリスを用いることで様々な展開が期待できる。その展開として第一
315 に考えられるのが、HP の機能評価による冬眠調節中枢の解明である。HP は脳において冬眠を誘導することが予想されていることから、脳内に HP が作用する冬眠の受容体があることが考えられており、HP をリガンドとする HP レセプターの同定と、それによる HP の作用機序が明らかとなれば、冬眠の分子メカニズムの全容がわかる可能性が考えられる。しかし、現在までに、HP の機能や、作用部位、レセプターはわかっておらず、今後の研究に期
320 待される。シマリスを用いた冬眠研究で次に期待できるのは、低体温が指標として用いられてきた冬眠研究において、冬眠調節と概年リズムを結び付ける新たな分子指標 HP の周期性を利用することで、シマリスの内因的な冬眠ステージをモニタリングすることができる点である。冬眠動物の研究が進んでこなかった一因として、前節でも述べたとおり、比較系を揃えることの困難さが挙げられている。HP は、血中を内因的な冬眠周期によって増減する

325 ことが知られており、シマリスの個体の HP をモニタリングすることで、その個体の冬眠周
期におけるステージを予測することができることが考えられる。そのため、シマリスを冬眠
の研究に用いることで、今まで不可能であった、冬眠周期における内因的な生理状態を揃え
た比較系を作ることができ、冬眠研究を行う上での重要なツールとして用いることができ
ると考えられる。さらに、シマリスの HP の研究の過程で、内因的な概年リズムに基づいた
330 HP の周期的な変動が無く、生涯冬眠を行うことができない冬眠様式の種内変異（以下、非
冬眠シマリス）の存在が明らかとなってきた（Kondo et al. 2006）。これにより、これまでの
冬眠研究で行われてきた、体温などの生理的なバックグラウンドが異なる活動期と冬眠期
という状態間での比較や、遺伝的なバックグラウンドが異なる種間での比較に加えて、新た
に遺伝的なバックグラウンドが同じシマリス種内で HP などの概年的な周期性を持つ因子
335 の影響を受けない個体を用いた比較系を得ることができ、多型間での生理的な比較や遺伝
的な解析による冬眠調節に重要な因子の探索への応用が期待される。

以上からシマリスを冬眠研究に用いることで、これまでの冬眠の研究では行うことがで
きなかった、様々な評価をすることができると考えられ、冬眠の研究を進める上で重要な実
験対象動物になると考えられる。

340

1-8. 本研究の目的

本研究では、冬眠の低体温、低代謝調節のメカニズムを明らかにすることを目的としてお
り、そのために本研究では代謝調節因子である AMPK に着目して研究を行う。AMPK は、
視床下部などの中枢組織で活性化することで摂食調節を始めとした様々な体の代謝調節に
345 関わっているとされ、冬眠における低代謝、低体温を誘導すると考えられている摂食調節系
と密接な関わりがある因子である。また AMPK は、シマリスの冬眠を調節するとされる HP
が属する Clq ファミリーのタンパク質によって活性化される酵素であることから、シマリ
スなどの冬眠動物における冬眠調節に関わっている可能性が高いと考えられる。そこで2章

では、AMPK が HP などの冬眠調節を受けている中枢組織では活性化するが、直接の調節を
350 受けていない末梢組織では活性化しないという仮定のもと、活動期と冬眠期のシマリスに
おいて AMPK 及びその下流のシグナル因子の発現量を、脳組織と末梢組織において比較す
る。また、どのような組織で活動期から冬眠期にかけて AMPK の活性が変化するかを示す
ことで、代謝調節因子である AMPK がシマリスの冬眠時に起こる体温や代謝の調節にどの
ように関わっているかを示す。3 章では、HP の年周的な冬眠リズムが無く、冬眠できない
355 シマリスの種内変異とされる「非冬眠タイプ」のシマリスを用いることで、2 章で示された
冬眠に併せて脳内で起こる AMPK 活性の変化が、概年的な冬眠リズムに関連して起こるこ
とを示す。4 章では、活動期と比較して冬眠期の脳で起こる AMPK 活性の変化が、冬眠に
先立って起こるかを調べることで、その AMPK の変化が冬眠期の低体温に依存せず、HP な
どの冬眠の調節系によって起こるものであることを示す。さらに、冬眠期のシマリスの AMPK
360 の活性を阻害することで冬眠の抑制が起こるかどうかを調べることで、活動期から冬眠期
に起こる AMPK の活性化が冬眠の低体温誘導に重要な変化であるかを明らかにする。最後
に 5 章では、2～4 章までの結果を踏まえて、冬眠調節の中で AMPK の挙動がどのように
変化するのか、また冬眠の代謝調節における AMPK の生理的な意義について論じる。

365

370

2章. シマリスの各組織における AMPK シグナル系の活動期と冬眠期の比較

375 はじめに

冬眠は、冬の厳しい寒さと食糧不足を乗り切るため、一部の哺乳類が行う適応的な生存戦略である。哺乳類における冬眠は、体温や代謝が一年を通して劇的に変化する。シマリスでは、冬眠中に体温が 0°C 近くまで下がり、代謝率や心拍数も著しく減少する (Geiser 2004, 川道ら 2000)。他の冬眠動物においても、このような体温・代謝の著しい抑制が共通して起こることがわかっており、冬眠の体温・代謝抑制のメカニズムを明らかにしようと、これまでに様々な研究がされてきた。しかしながら、このような、極度の低体温および低代謝を引き起こす冬眠調節に関し、冬眠を誘導する物質などはほとんど見つかっていない。その中で、シマリスにおいて発見されている冬眠特異的タンパク質 (HP) は、冬眠誘導物質として唯一発見されているタンパク質である (Kondo and Kondo 1992)。HP は、アディポネクチンや TNF- α が属する C1q ファミリーのタンパク質で、シマリスの肝臓でのみ発現しており、冬眠する時期になると脳内へ移行することで冬眠を誘導することが報告されている (Kondo et al. 2006)。現在までに HP の機能や、作用する脳の部位などは明らかになっていないものの、HP の発見により冬眠の中枢が脳にあることが示されてきた。また、体の代謝中枢である間脳や、視床下部に存在する摂食中枢の抑制により、冬眠ほどの極度なものではないが、低体温・低代謝が誘導されることが示されている (Sunagawa and Takahashi 2016)。この摂食抑制による代謝抑制は、哺乳類に共通して存在する神経機構といわれており、冬眠における代謝の抑制もこの神経系を介して起きていることが示唆されている (Takahashi et al. 2020)。したがって、冬眠における低体温・低代謝の調節メカニズムを明らかにする上で、脳における代謝調節系に関わる分子や神経に着目することは、非常に重要なアプローチであると考えられる。

体の代謝調節の中心となる分子の一つに AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) とい

うタンパク質がある。AMPK は、様々な細胞に存在するセリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種で、AMP/ATP 比を検出することで細胞のエネルギー状態を感知し、代謝を調節している(Hardie 2004)。AMPK は、栄養不足や低酸素症などで ATP レベルが低下すると、

400 AMPK α サブユニットの Thr172 残基がリン酸化され、活性化する(Hardie 2004, Kemp et al. 2003, Witters et al. 2006)。AMPK は細胞内のエネルギー代謝を調節するために、下流に様々なシグナルカスケードを持っており、それらの活性を調節することで細胞内のエネルギーの恒常性を保っている。例えば、細胞内エネルギー通貨である ATP レベルが低下して AMPK が活性化されると、mamalian Target of rapamycin (mTOR) を中心とした mTOR 複合体 1

405 (mTORC1) を抑制することにより、オートファジーなどのエネルギー生成異化経路を促進し、脂肪酸合成、糖新生、タンパク質合成などのエネルギー消費同化経路を阻害することが知られている(Inoki et al. 2003)。特にタンパク質や脂肪酸の合成は細胞内の細胞内代謝過程においてエネルギー需要が高く、AMPK に抑制されるシグナル系としてよく研究されている。AMPK の下流に位置する eukaryotic Elongation factor 2 (eEF2) は、ペプチジル tRNA を

410 リボソームの A サイトから P サイトへと移動させ、翻訳の伸長を制御する GTPase であり、普段は mTOR の下流のシグナル系により活性を正に調節されているが、eEF2 をリン酸化するキナーゼである eEF2 Kinase(eEF2K)により eEF2 の Thr56 がリン酸化されると、eEF2 はリボソームと結合できなくなり負に調整される(Ryazanov et al, 1988)。その結果として、eEF2 がリン酸化により抑制されると、タンパク質合成の過程である翻訳が抑制され、タンパク質

415 合成の全体が低下することが知られている。活性化した AMPK は、Tuberous Sclerosis Complex (TSC)のリン酸化を介した mTOR の抑制と、eEF2K の Ser398、Ser491/492 をリン酸化してその活性を高め、結果として eEF2 の不活性化を行い、タンパク質合成を抑制し、エネルギー消費の抑制を行うことが報告されている(Browne et al. 2004, Johanns et al. 2017)。

また、AMPK は、Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)の Ser79 のリン酸化をすることで、脂肪酸

420 の生合成を抑制することが知られる(Hardie 2004)。ACC は、ATP を消費し、Acetyl-CoA か

ら Malonyl-CoA へのカルボキシル化を触媒する酵素である(Corbett and Harwood 2007)。ACC
により生成された Malonyl-CoA は、脂肪酸合成の基質として用いられる他に、脂肪酸の β
酸化を抑制することが知られ、ACC の機能としては、エネルギーを作る脂肪酸のベータ酸
化の抑制と、エネルギーを消費する脂肪酸の生合成の 2 つあることが知られている。AMPK
425 による ACC のリン酸化は、この ACC による触媒効果を抑制することが知られ、AMPK は
ACC の抑制を介して、脂肪酸の生合成と、脂肪酸の β 酸化の促進を行っており、細胞内の
エネルギー状態を正に調節する (Kahn et al. 2005)。さらに近年では、AMPK は細胞内でエネ
ルギー恒常性を維持するだけでなく、中枢組織において、体のエネルギー状態を感知し、全
身のエネルギー調節を行うことも報告された(López et al. 2016)。AMPK は視床下部の神経細
430 胞内において、全身のエネルギー状態への応答や、ホルモンの作用を伝達することで摂食行
動を調節することや、褐色脂肪組織における熱産生を通じて体温調節に重要な役割を果た
すことが明らかになっている(Minokoshi et al. 2008; Liu et al. 2020)。そのため AMPK は、細
胞や組織レベルを越えて、全身の代謝の恒常性に関わっていると考えられている。

以上から AMPK は、細胞や組織における代謝を、下流のシグナル系を調節することでコ
435 ントロールしており、また、中枢組織において、摂食や体温調節など体全体の代謝調節を行
うことが報告されており、冬眠における著しい代謝・体温の抑制にも関与していると考えら
れてきた。これまでに、ジリスを始めとする冬眠動物のいくつかの種では、AMPK をはじめ
とするこれらのタンパク質の活性や発現量が、活動期と比較して冬眠期に変化することが
報告されている(Horman et al. 2005, Heally et al. 2011)。しかし、これまでに冬眠動物におい
440 て、AMPK のシグナル系に関し、特に冬眠の中枢組織となる脳においての評価はされてお
らず、また脳における機能はわかっていない。

本章では、AMPK が冬眠において、脳内で活性が変化するタンパク質であるかどうかを明
らかにすることを目的とする。そのために、本章では、冬眠動物で唯一冬眠誘導物質が見つ
かっており、冬眠の中枢が脳に存在することが報告されているシマリスにおいて、活動期と

- 445 比較して冬眠期に AMPK シグナル系がどのような組織で活性化するかを明らかにし、冬眠における代謝調節との関わりを考察する。

方法

実験に用いた試薬および抗体

- 450 本研究に用いた抗体を下記に記す。AMPK と ACC の total 量とリン酸化量をそれぞれ検出するために anti-AMPK、anti-phospho-AMPK α (40H9)、anti-ACC:anti-phospho-ACC(Ser79) (Cell Signaling Tecnology) を用いた。また、eEF2 とリン酸化-eEF2 対しての抗体は Inamura et al.(2005)で作成された抗体を用いた。

455 供試動物

本研究では、すべての実験にチョウセンシマリス *Tamias sibiricus* (以下、シマリス) が用いられた。シマリスは、5°C、恒暗条件下で個別に飼育された。各個体は、標準的なネズミ用飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社) および水が与えられ、それぞれを自由に摂取できる状態で飼育された。

- 460 すべての動物実験は、動物実験倫理委員会により審査され、新潟大学学長により承認された動物実験計画に沿って実施された(承認番号「NiigataUniv.Res258-1」)。実験のプロトコルは「Guiding Principles for Care and Use of Laboratory Animals」(米国 NIH) に準拠して行われた。

465 シマリスの活動期および冬眠期の決定

実験に用いたシマリスの活動期と冬眠期を決定するため、赤外線照射温度計 (IT-540-N、HORIBA 社製) を用いた体温測定が、1日1回、1年以上にわたり行われた。表面体温計測値が 10°C以下を示したときを冬眠状態とした。

組織の採材

470 実験に供試された活動期のシマリスは、密閉された容器の中で二酸化炭素ガスによる麻痺状態のもとで断頭された。また、冬眠期のシマリスは冬眠状態のもとで断頭された。断頭時に、頸部から流出する血液を採取することにより、死亡時の血液の採取が行われた。次に、断頭された頭部は開頭後、脳が取り出され、氷上で大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部の5部位に分けて採取された。さらに、開腹後、肝臓、腎臓、筋肉、心臓が採材された。採材された組織および血液はドライアイスで凍結後、解析まで -80°C のディープフリーザーで保存された。

血糖値の測定

血糖値の測定は、血糖値自己測定機 (Freestyle Freedom, NIPRO) を用いて行われた。凍結保存されていた血液を氷上で融解させた後、 $0.3\mu\text{l}$ 程の血液を測定に用いた。

ウェスタンブロッティング

凍結保存された各組織は重量を計測した後、Lysis Buffer(2%SDS、62.5mM Tris-HCl(pH6.8)、蛋白分解酵素阻害剤 (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche Applied Science Ltd.)、脱リン酸化酵素阻害剤 (PhosSTOP; Roche Applied Science Ltd.))でホモジェナイズした。ホモジェナイズした溶液を遠心分離し(15,000rpm \times 60min)、上清を用いた。試料の一部は Micro BCA Reagent Kit(PIERCE Ltd.)を用いて、MICRO PLATE READER (BIO-RAD Ltd.) でタンパク質量を定量した。その後、試料は Sample Buffer(2M Tris-HCl(pH6.8)、10%SDS、グリセロール、Bromophenol Blue、2-mercaptoethanol)と混合し、総タンパク量が1ウェルあたりに等量含まれるように調整された後に、10%または7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ゲルは PVDF メンブレンに転写し、10%BSA (ALBUMIN BOVINE(SIGMA)) /TNT (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.4, 0.05%Tween-20)でブロッッキングした。その後、メンブレンに一

次抗体を添加し、オーバーナイトで反応させた。一次抗体を TNT で洗浄した後、ウサギ由来の抗体に対しては Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP(DakoCytomation)を、マウス由来の抗体に対しては Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse IgG(H+L)(Jackson Immuno Research Inc.)を二次抗体としていずれも 1 : 10000 の濃度で希釈した後、一時間室温で反応させた。抗体反応終了後、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) を用いた化学発光反応を行い、X 線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM) に感光させることによりタンパク質の発現量を検出した。

500 検出されたシグナルは、スキャナーで取り込んだものをデジタル化した。その後 ImageJ を使用した画像解析でバンドの濃さを数値化した。算出された値は、いずれも覚醒リスの平均値を 100 としたときの相対値として表わされた。

統計解析

505 すべての値は、平均±標準誤差で表された。データの分布が正規分布の時にはスチューデントの t 検定を用いて統計的な有意性を求めた。データが正規分布しないときには Wilcoxon rank sum test を用いて統計的な有意性を求めた。本研究では、p 値が 0.05 未満のときを有意差があるとした。

510 結果

活動期と冬眠期のエネルギー状態の比較

組織の採材は、毎日の表面体温の測定に基づいて決定された、シマリスの冬眠周期における活動期と冬眠期に行われた(図 2-1)。グルコースは AMPK の主要な制御因子であるため、活動期と冬眠期の両方で血糖値により測定された (図 2-2)。冬眠期において、シマリスは低体温になることで活動が停止し、採餌行動も行わないことから、血糖値が低下していることが予想されていたが、期待されたとおり、血糖値は活動期が $230.2 \pm 35.8 \text{mg/dL}$ であった

のに対し、冬眠期には 78 ± 8.5 mg/dL となり、冬眠期に有意に低下していた(t-test, $t=4.14$, $p=0.01$)。このことから、少なくとも冬眠中のシマリスでは、エネルギー状態が低下していることが考えられた。

520

各組織における AMPK シグナル系の発現量の季節間比較

AMPK の活性化状態を反映するリン酸化 AMPK (Thr172) を、活動期および冬眠期のシマリスの 5 つの脳領域でウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、活動期と比較して、冬眠期に AMPK のリン酸化が有意に亢進したのは、大脳皮質と間脳の 2 つの組織のみであった(大脳皮質: t-test, $t=5.3$, $p<0.01$, 間脳: t-検定, $t=5.9$, $p<0.01$) (図 2-3,2-4(a),(d))。さらに、大脳皮質と間脳では、活動期に比べて、冬眠期にリン酸化 ACC(Ser79)とリン酸化 eEF2(Thr56)も併せて増加する傾向が見られた(大脳皮質-リン酸化 ACC: t-test, $t=1.58$, $p=0.15$, 大脳皮質-リン酸化 eEF2: t-test, $t=1.85$, $p<0.01$, 間脳-リン酸化 ACC: Wilcoxon rank sum test, $W=4$, $p=0.09$, 間脳-リン酸化 eEF2: t-test, $t=5.41$, $p<0.01$)(図 2-5(a)(d),図 2-6(a)(d))。ACC は AMPK の直接の基質であり、また eEF2 は、間接的ながらも、AMPK の活性化に従いリン酸化が亢進するタンパク質として知られていることから、活動期から冬眠期にかけてのリン酸化 ACC およびリン酸化 eEF2 の増加は、大脳皮質や間脳における AMPK の活性が高まっていることを示している。一方で、小脳および視床下部では、AMPK における活動期と冬眠期のリン酸化量の統計的な差異は見られなかったものの、活動期から冬眠期にかけての活性の上昇傾向が見られた (図 2-4(d)(e))。さらに、小脳や視床下部では、活動期に比べて、冬眠期に ACC や eEF2 のリン酸化が増加する傾向が見られた(小脳-リン酸化 ACC : t-test, $t=-4.62$, $p<0.01$,小脳-リン酸化 eEF2: t-test, $t=-2.67$, $p=0.02$,視床下部-リン酸化 ACC: t-test, $t=-4.52$, $p=0.002$, 視床下部-リン酸化 eEF2: t-test, $t=2.03$, $p=0.08$) (図 2-5(d),(e),図 2-6(d)(e))。このことから、小脳や視床下部においても、AMPK の活性が活動期と比較して冬眠期に亢進している可能性が高い。海馬では、採材した期間の間で、AMPK と eEF2 のリン酸化量にほとんど

540

変化が見られなかった(図 2-4(b),図 2-5(b))。一方で、ACC のリン酸化量に活動期から冬眠期にかけて有意な増加が見られた(t-test, $t=-4.62$, $p<0.01$)(図 2-5(b))。

末梢組織においては、活動期から冬眠期にかけて、血糖値が低下していたにも拘わらず、AMPK のリン酸化が見られた組織はなかった。特に、活動期と比較して、肝臓では AMPK
545 のリン酸化が有意に減少していた(t-test, $t=-4.15$, $p<0.01$)(図 2-4(k))。また、AMPK シグナル系
の下流の因子である ACC のリン酸化に関しても、活動期と比較して冬眠期にリン酸化が増
加する組織は見られなかった。eEF2 のリン酸化については、筋肉と腎臓で活動期から冬眠
期にかけて、発現が有意に増加していた(筋肉-リン酸化 eEF2: t-test, $t=2.75$, $p=0.03$, 腎臓-リ
ン酸化 eEF2: Wilcoxon rank sum test, $W=2$, $p=0.03$) (図 2-6(l),(m))。

550 なお、すべてのウェスタンブロッティングで得られたシグナルの図は付録 2-1 に示した。

考察

本研究では、活動期と比較したときの冬眠期におけるシマリスの中枢組織および末梢組
織において代謝調節因子である AMPK が活性化するかを明らかにするために、AMPK およ
555 び下流のシグナル伝達経路のリン酸化量を調べた。活動期と比較した時に冬眠期のシマリ
スの脳では、全体的に AMPK のリン酸化と ACC および eEF2 のリン酸化が上昇する傾向が
見られ、AMPK 活性の上昇が見られることがわかった。一方で、末梢組織では、全体的に
AMPK に関しても、また下流の ACC および eEF2 に関しても、リン酸化量において活動期
と冬眠期の間で変化が見られないことから、AMPK 活性に採材時期間での変化が見られな
560 いことが明らかとなった。

冬眠期に末梢組織で AMPK の活性が上昇しなかったことは、これまでに行われたジリス
の研究結果と一致する(Horman et al. 2005)。特に、肝臓や骨格筋はエネルギー源となるグリ
コーゲンを合成していて、細胞内に貯蔵するため、血糖値の低下に AMPK 活性がすぐに反
応しない可能性が考えられる。そのため、絶食する期間が長くなるに従い、細胞内に貯蔵さ

565 れたエネルギー源が減少し、AMPK 活性が変化する可能性がある。実際、ラットの肝臓や骨
格筋における AMPK のリン酸化は、短期間の絶食では変化しないことが報告されている
(Kajita et al. 2008)。さらに、長期のカロリー制限を行うと、ラットの肝臓におけるリン酸化
の発現量はむしろ低下することが知られている(To et al. 2007)。一方で、末梢組織とは対照
570 的に、活動期と比較した冬眠期のシマリスの中脳組織では AMPK に加え ACC や eEF2 のリ
ン酸化量が増加する傾向が見られたが、これはジュウサンセンジリスの全脳を用いた研究
では見られなかった (Horman et al. 2005)。ジリスの脳において AMPK の変化が見られな
かったのは、本研究におけるシマリスにも見られるように、脳の部位ごとに、リン酸化 AMPK
の発現量に差があることが原因で、AMPK のリン酸化の変化量が相殺されてしまった可能
性が考えられる。一般的に、脳内では、グリコーゲンの貯蔵量や脂肪酸の β 酸化が制限され
575 ており、ほぼすべてのエネルギーが血中グルコースに由来する。したがって、冬眠期に見ら
れる血糖値の低下は、エネルギーを貯蔵する末梢器官ではなく、脳における AMPK 活性に
急速に影響を与えると考えられる。しかし、これだけでは、冬眠期に見られる脳領域の
AMPK のリン酸化と末梢組織における AMPK がリン酸化していない理由を説明することは
できない。したがって、脳における AMPK のリン酸化状態や活性の制御がどのようにして
580 行われているかを明らかにするには、さらなる研究が必要である。

活動期から冬眠期にかけて生じた AMPK の活性化に伴い、脳内では eEF2 のリン酸化 (不
活性化) が見られたが、末梢組織では見られなかった。Hallenbeck らのグループは、冬眠中
のジリスの脳において、eEF2 のリン酸化と伸長速度の低下を示すリボソーム通過時間の延
長と、それに伴うタンパク質合成の低下を報告している(Chen et al. 2001, Frerich et al. 1998)。
585 したがって、冬眠中のジリスでは、脳内での eEF2 の不活性化がタンパク質合成を低下させ
る共通のメカニズムである可能性がある。また、eEF2 の脱リン酸化酵素であるプロテイン
ホスファターゼ 2A(PP2A)の活性の低下も、冬眠中のジリスの脳内で報告されている(Frerick
et al. 1998)。これらの既往の研究を踏まえると、シマリスにおける脳内でも、eEF2 のリン酸

化によるタンパク質合成の抑制が起きている可能性は考えられる。今回の研究では、eEF2
590 や ACC などの AMPK の下流のタンパク質のリン酸化状態の評価のみにとどまっているが、
今後は、冬眠期のシマリス脳内における AMPK の活性化に伴って起こる、細胞内の代謝機
能の評価も必要となってくるだろう。

一方、細胞のエネルギー状態とは別に、細胞の種類による低体温に応答した Ca²⁺の動態
の違いが、AMPK と eEF2 のリン酸化に影響を与える可能性がある (Knight et al. 2015)。
595 AMPK は、カルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CaMKK) に
よってリン酸化され、eEF2 は、eEF2K (カルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナ
ーゼ III) (Narin et al. 1987)によってリン酸化される。両キナーゼの活性は、Ca²⁺依存性であ
る。冬眠期の心筋細胞では、細胞内の Ca²⁺動態が活動期と変化することが知られており
(Kondo and Shibata 1984)、細胞の種類に応じて Ca²⁺の動態が変化することで、AMPK と eEF2
600 の活性が組織間で異なることが示唆されている。実際、寒冷ストレスによる eEF2K の活性
化は、Ca²⁺のアップレギュレーションを介して行われることが以前に報告されている
(Knight et al. 2015)ことから、様々な組織における AMPK や eEF2 のリン酸化の違いや、腎
臓や筋肉で見られた冬眠期における eEF2 のリン酸化は、低体温に応じた Ca²⁺動態の細
胞による違いに起因する可能性も考えられる。

605 末梢組織とは対比的に、脳組織のみで冬眠期に AMPK が特異的に活性化される理由とし
ては、HP20、HP25、HP27 からなる冬眠特異的タンパク質複合体 (HPc) が関与している可
能性も考えられる。HP は、N 末端領域にコラーゲン様ドメインを持ち、3 重螺旋構造を形
成している (Takamatsu et al. 1993)。構造的に、HP は C1q タンパク質ファミリーに属するこ
とが予測されている (Takamatsu et al. 1993, Kishore et al. 2004)。このファミリーに属するア
610 ディポネクチンや CTRP は、AMPK の活性化を誘導することが報告されている (Yamauchi et
al. 2002, Wei et al. 2011)。さらに、HP は脳内で作用することが示唆されているので (Kondo et
al. 2006)、冬眠期の脳における AMPK の活性化は、冬眠調節の下で HP が脳内に移行した結

果として生じている可能性が考えられる。

615 また、AMPK の活性を変化させる要因として他に考えられることとして、動物の概年的な体内の季節調節や概日的なリズムによるものがある。今回の研究では、シマリスは、恒暗条件で飼育されていたため、概日リズムがフリーランしており、各シグナル分子の変化やそのリン酸化状態は、その影響を受けていた可能性も考えられる。実際、AMPK 活性の概日変化はラットで報告されており(Davis et al. 1992)。また、AMPK は概日周期自体に影響をもたらす分子であることから(Bailey et al. 2014)、本研究に見られた AMPK の活性化は、概日リズムによる可能性がある。また、冬眠する哺乳類だけでなく、様々な野生動物は概年的な周期により体の状態が変化することが知られており、季節的なエネルギー需要に応答して AMPK の活性が変化することも報告されている(Kinnunen et al. 2016)。今回の研究では、AMPK と様々なリズム因子との関連性を示すことはできなかったが、今後の冬眠研究における AMPK の研究のポイントとしては重要な課題であると考えられる。

625 今回の研究結果から、活動期と比較して冬眠期の脳では、AMPK の活性が上昇する可能性が示唆された。冬眠時におこる様々な代謝調節は、脳にその中枢があると考えられており、今回の結果から、冬眠期の脳特異的に活性化する AMPK が、それらの代謝調節に関与する可能性が考えられる。しかし、本章の結果のみでは、AMPK が冬眠調節のもとで活性化するのか、血糖値や低体温の低下による体内の環境の変化によるものなのかわかっていない。今後は、冬眠の調節と AMPK が関与するのかを明らかにするためには、冬眠調節系と AMPK の関わりを明らかにしていく必要があるだろう。以降の章では、この冬眠調節系と AMPK の活性調節の関わりについてを検証していく。

635

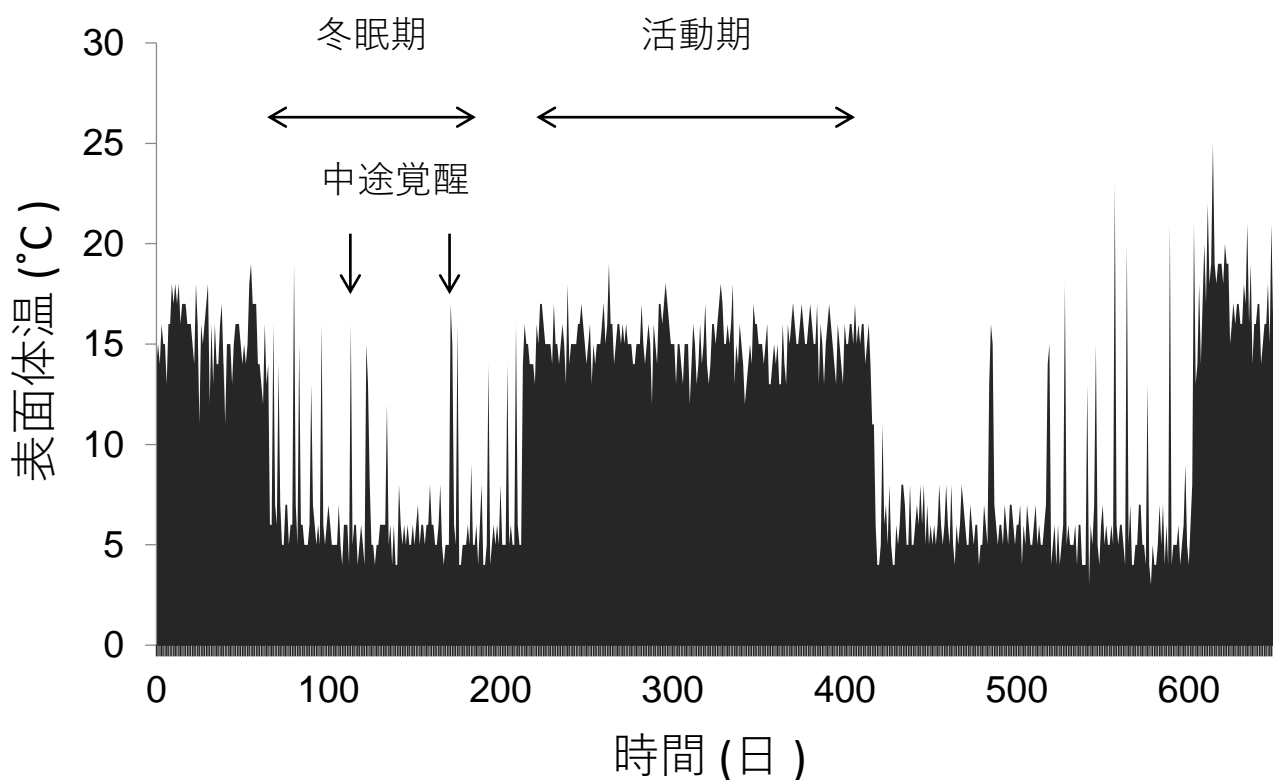


図2-1. シマリスの冬眠における表面体温の変化.

赤外線照射温度計でモニターした体表温度の変化。シマリスでは、体温の推移を測定することで、冬眠する時期の冬眠期と、冬眠しない時期の活動期を明確に分けることができる。また、シマリスなどの冬眠における冬眠期には、周期的に覚醒を繰り返す、中途覚醒が見られる。図中のシマリスにおける中途覚醒は矢印で示す。

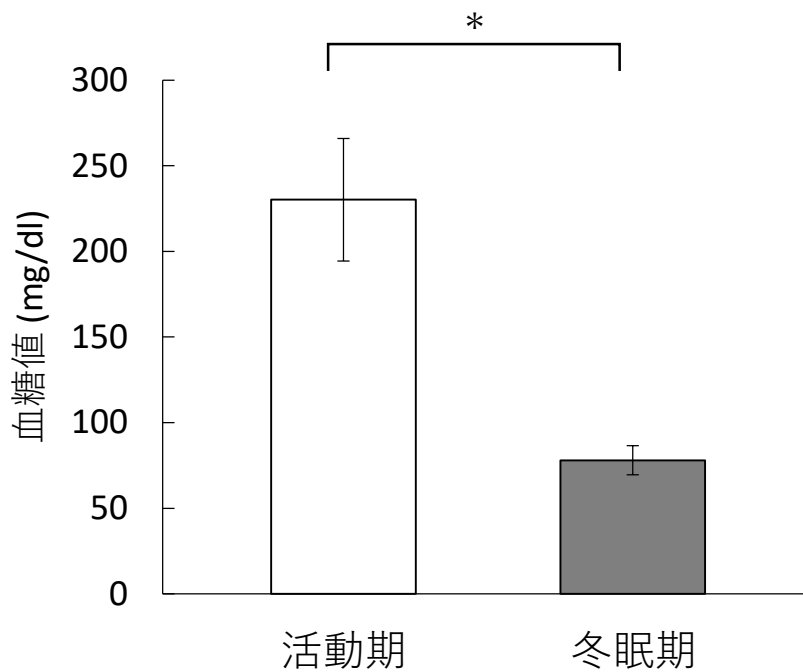


図2-2. シマリスの血糖値の活動期と冬眠期における比較.

血糖値は、活動期 (white bar, n=5) と冬眠期 (grey bar, n=5) においてそれぞれ採取された血液を用いて測定された。グラフの値は平均値 ± SE で表される。

*p < 0.05 (Student's t-test)

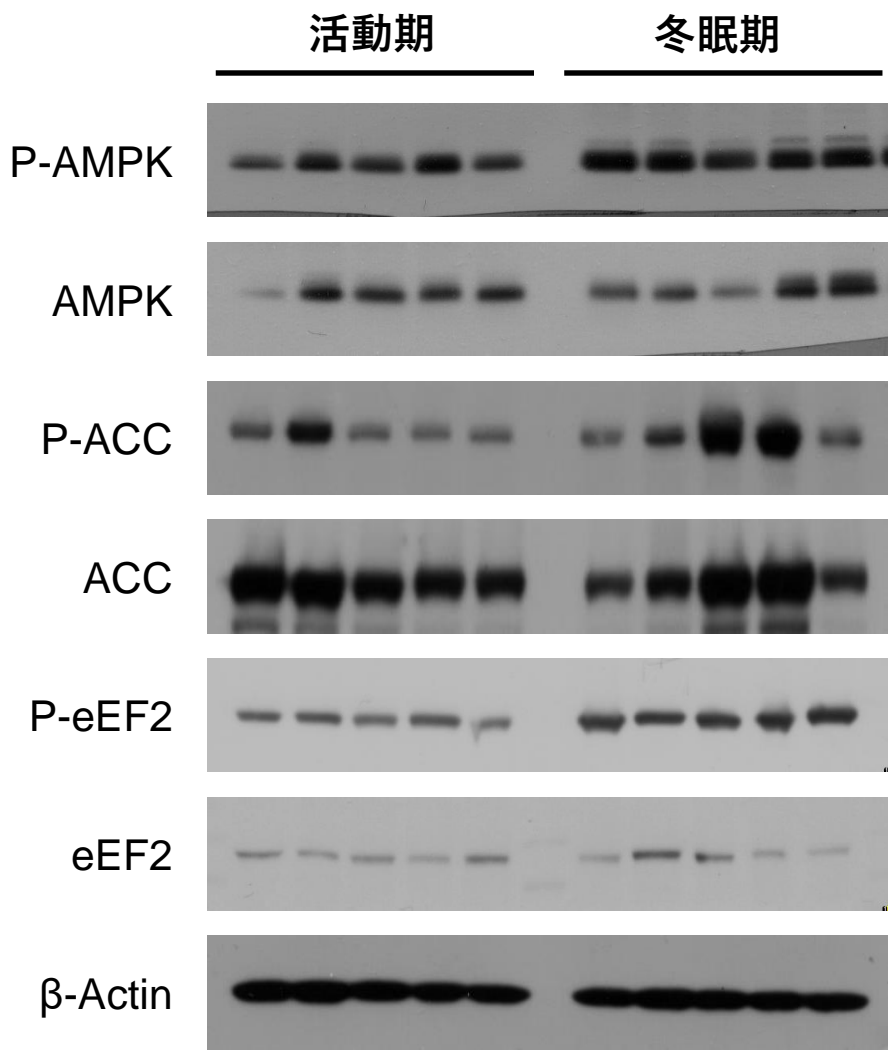


図2-3. シマリスの間脳における各タンパク質のWestern blottingによる定量化の例.

各タンパク質の発現量はWestern blotting法を用いて定量化された。組織を可溶化バッファーに溶かした後に、SDS-PAGEを行い、分子量ごとにゲル上で分離した。SDS-PAGEでサンプルバッファー内のタンパク質を分離後、PVDFメンブレンにタンパク質を転写し、検出したいタンパク質を抗体免疫反応を利用することで蛍光発光させ、その光をX線フィルムに焼き付けることで、各タンパク質の発現量をバンドの濃さとして定量化した。本図は、間脳から検出した各タンパク質のバンドを表したものを、Western blottingによって得られるバンドの代表例として表したものである。活動期と冬眠期の各タンパク質の発現量の比較は、各バンドをImageJを用いて数値化して行った。

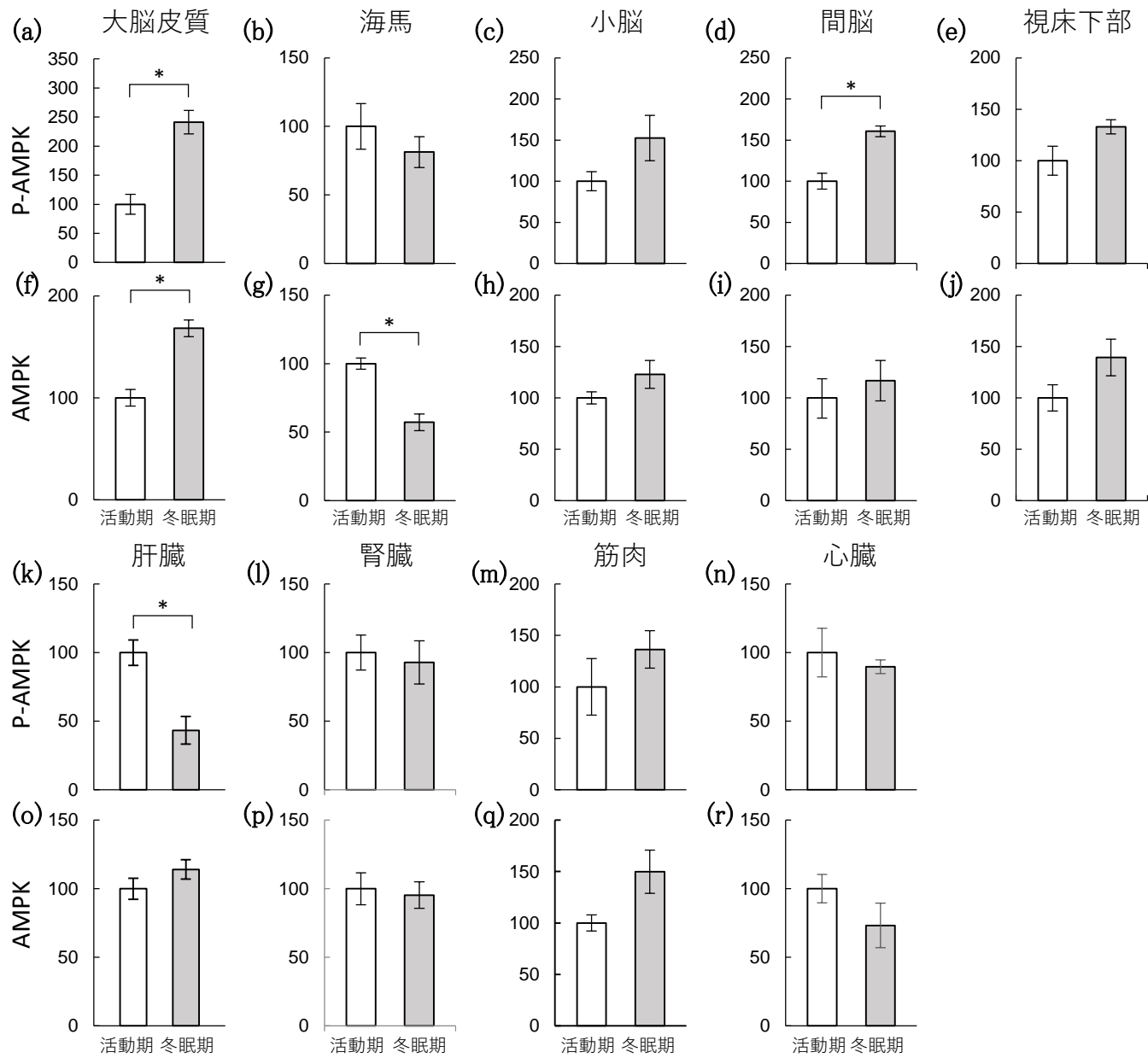


図2-4.各組織におけるリン酸化AMPKとtotal-AMPKの発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(j); P-AMPK, (a~e,k~n); AMPK, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す (n=5) 。*p<0.05 (wilcox rank sum test (g, i, k, l, n)またはstudent' t-test (残りすべて)) 。

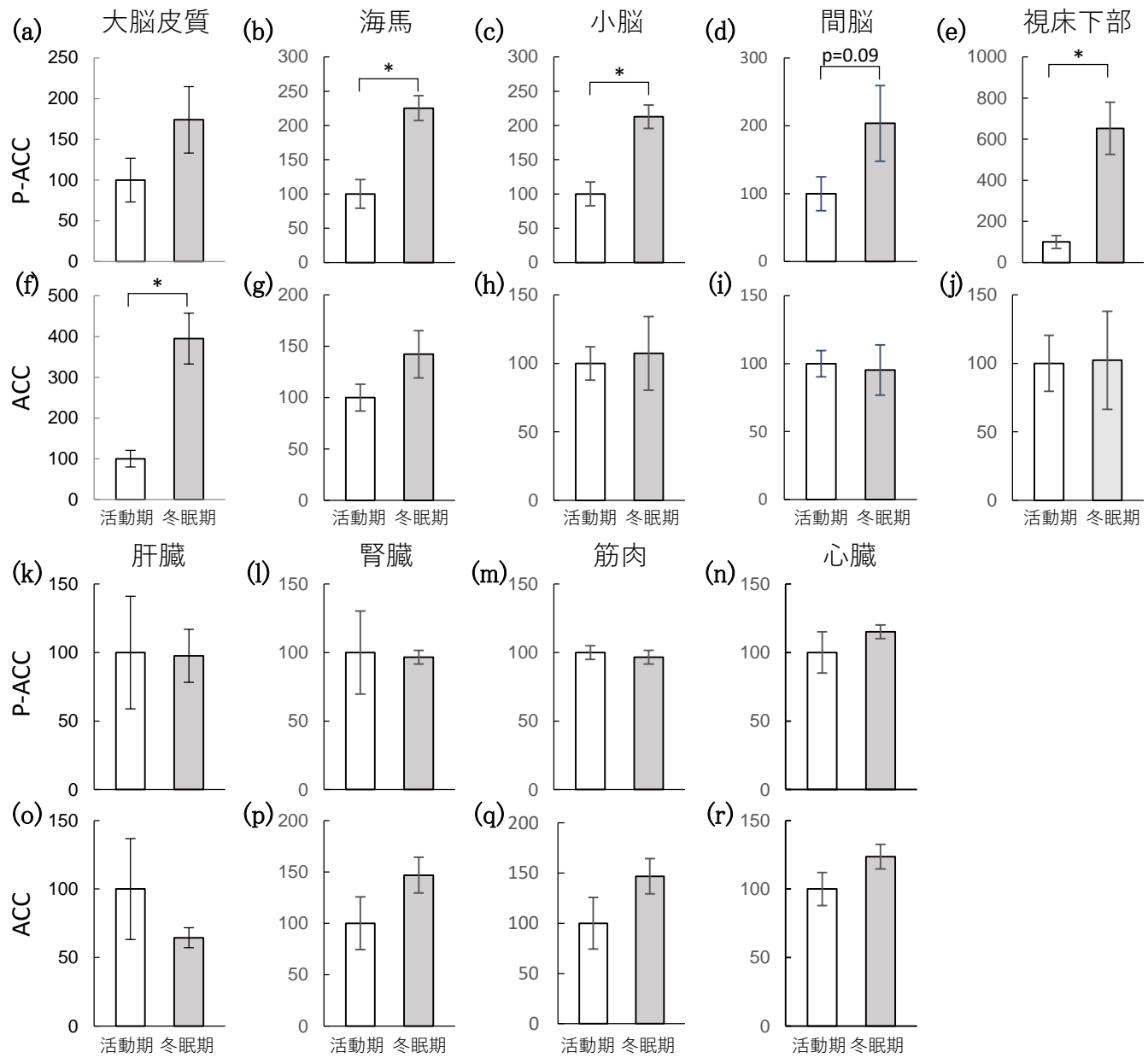


図2-5.各組織におけるリン酸化ACCとtotal-ACCの発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるACCのリン酸化量とトータル量をウエスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(j); P-ACC, (a~e,k~n); ACC, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す (n=5)。*p<0.05 (Wilcoxon rank sum test (d, k, m), またはStudent's t-test (残りすべて))。

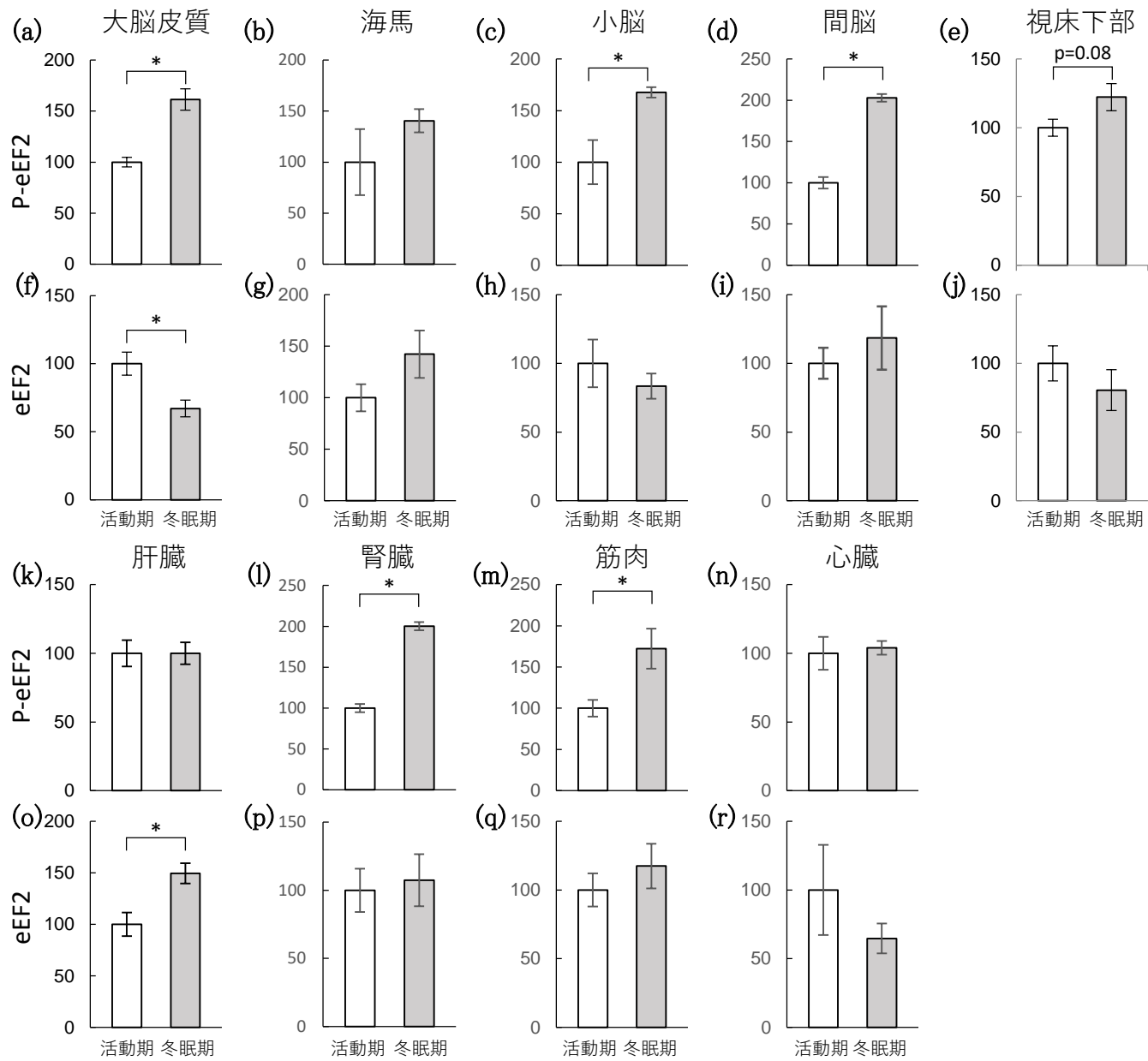


図2-6.各組織におけるリン酸化eEF2とtotal-eEF2の発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるeEF2のリン酸化量とトータル量をウエスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(l); P-eEF2, (a~e, k~n); eEF2, (f~h, o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す (n=5)。*p<0.05 (Wilcox rank sum test (l) またはStudent'sのt-test (残りすべて))。

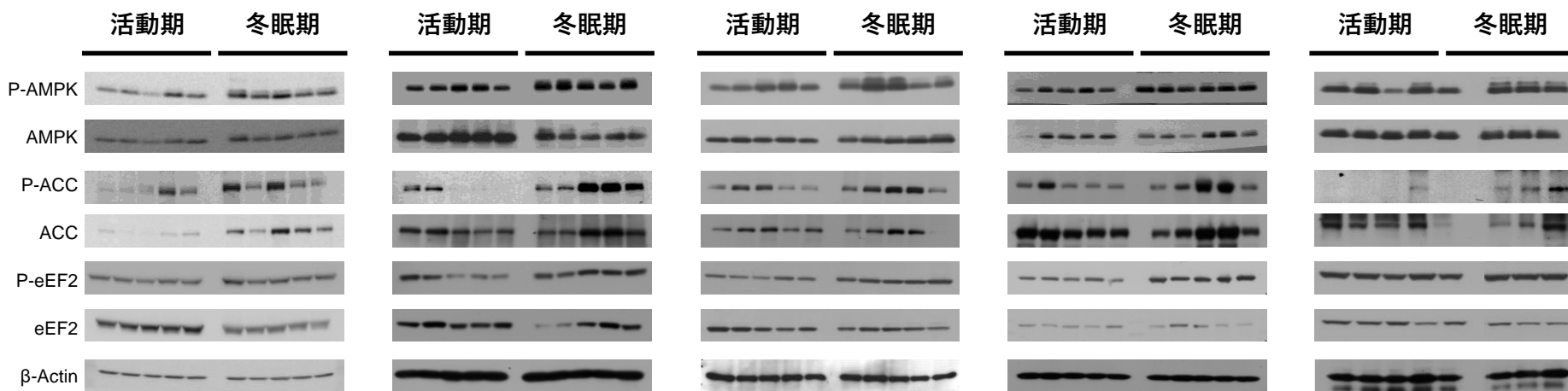
(a)大脳皮質

(b)海馬

(c)小脳

(d)間脳

(e)視床下部

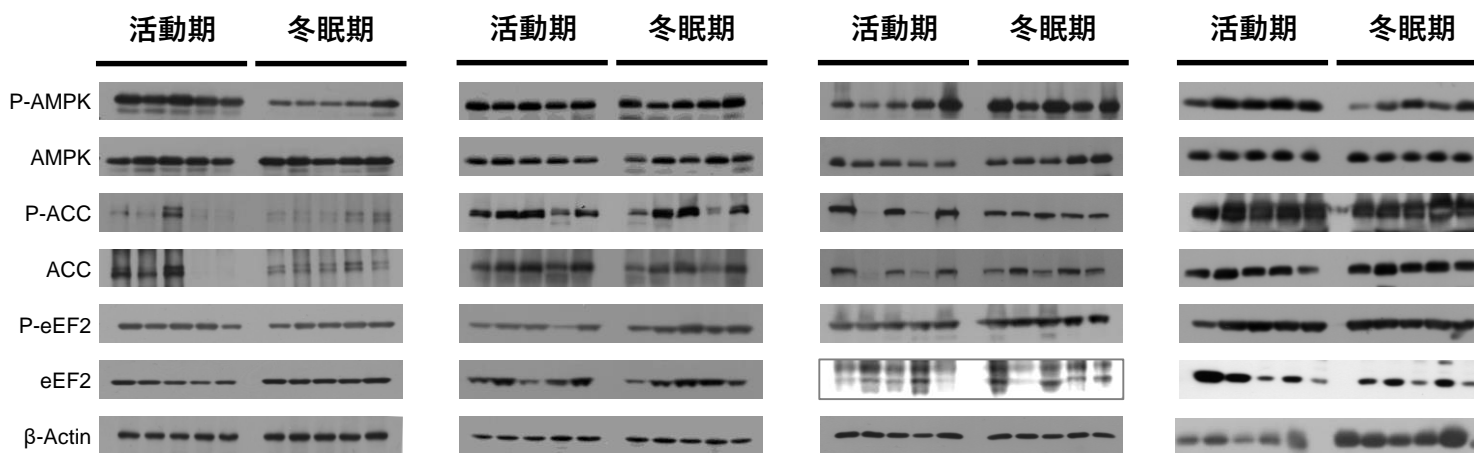


(f)肝臓

(g)腎臓

(h)筋肉

(i)心臓



付録.2-1 シマリスの各組織において行われたウェスタンブロッティングから得られたタンパク質の発現量

3 章. 冬眠様式の多型間に見られる季節的な AMPK シグナル調節系の違い

はじめに

640 季節の移り変わりの中で、野生生物たちは環境の変化に応じた様々な応答を見せる。鳥類の渡りや季節性の繁殖行動、気温や景観の変化に合わせた換毛など、その例は植物も含め枚挙にいとまがなく、季節の変化に応じた年周期的な生体コントロールは生物普遍的に必要な不可欠なものであるといえる(Zimova et al. 2018, Pérez et al. 2016)。その中でも、冬眠という現象は、気温が下がり食物条件も厳しくなる冬期に、体温や代謝機能を著しく低下させること
645 によって、冬を生き抜くための適応的な生存戦略であるといわれている(川道 ほか 2000)。特に、哺乳類における冬眠は、恒温動物であるにもかかわらず、代謝調節システムを季節的に変化させることによって、著しい低体温耐性を得る驚異的な仕組みを持つことが知られている。そのため、冬眠の代謝調節メカニズムは古くから興味を持たれ、調節メカニズムの解明に向けた様々な研究が行われてきた。例えば、冬眠の生理的な変化として、シマリスは
650 冬眠すると、体温、心拍数、呼吸数、代謝速度のいずれもが大幅に減少し、エネルギー消費量は、活動期の 13%にまで低下することが知られている(川道 ほか 2000)。また、ジュウサンセンジリスの脳組織に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な mRNA の発現解析では、ジリスの冬眠時期に併せて、摂食の促進や脂肪蓄積の促進に関わる遺伝子の発現量の増加などが明らかになってきている(Schwartz et al. 2013)。その他にも、活動期と比較して冬
655 眠期において、細胞内の機能タンパク質や遺伝子発現がどのように変化するかを明らかにするための取り組みが数多く行われている。その一方、従来の冬眠研究では、どのようなプロセスで冬眠に必要な代謝系が調節されているのか、低体温への順応が季節に応じて変化する仕組みが明らかになっておらず不明な点が未だに多い (Jastroch et al. 2016)。

2 章では、シマリスの冬眠において、代謝調節因子である AMPK が活動期と比較して脳
660 内で活性化することを明らかにした。AMPK は、あらゆる細胞に普遍的に存在しているタ

ンパク質であり、様々な細胞内の代謝プロセスに関わることで、細胞内のエネルギー恒常性を保っている(Hardie 2004)。また、間脳や視床下部における AMPK は、中枢組織を介して体温の調節や摂食調節に関わるなど、体全体の代謝調節への関与も報告されている(López et al. 2016)。このことから、活動期と比較したときの冬眠期のシマリスの脳内の全体で起こる AMPK の活性化は、冬眠における低体温に備えた季節的な代謝系の変化の調節に関与している可能性も高い。しかし、AMPK は、低体温や低血糖などの、体内の環境が変化することに対応しても変化することが知られることから、2章までに明らかとなってきた、活動期と比較して冬眠期のシマリスの脳内で起こる AMPK の活性化が、季節的な冬眠の調節のプロセスに関わる変化なのか、冬眠における低体温などに対応して副次的に起きた変化なのかわかっていない。そのため、AMPK が冬眠の季節的な代謝調節に関わっているかを明らかにするためには、季節的な冬眠調節メカニズムと脳内における AMPK の活性化にどのような関係があるのかを示す必要がある。

冬眠の季節的な調節メカニズムに関しては古くから研究されており、冬眠期に特異的に変化する生体内因子についてこれまでに調べてられてきた。その中でも、シマリスで発見された HP は、これまでに発見された唯一の冬眠誘導物質として知られ、冬眠調節のメカニズムに重要なタンパク質であると考えられている(Kondo and Kondo 1992)。HP は、HP-20、-25、-27 の Clq ファミリーに属するタンパク質からなる 3 量体に、セルピンスーパーファミリーに属する α 1-アンチトリプシンと類似した構造を持つ HP-55 が結合した、4 量体のタンパク質として発見された。HP は、シマリスの活動期において、肝臓で作られた後に血中に放出され、活動期には血中に高濃度で含まれているが、冬眠期が近づくにつれて血中濃度が減少し、冬眠する前になると脳内へと輸送され、冬眠が誘導されることが報告されている(Kondo et al. 2006)。このことから、シマリスにおける冬眠は、HP が内因的な概年リズムに基づいて生体内を移動することによって年周期的に引き起こされていると考えられており、これまでに低体温を指標として用いてきた冬眠研究において、HP は冬眠調節と概年リズムを結び

685 付ける新たな分子指標としての利用が期待できるようになった。さらに、HPの研究の過程
で、内因的な概年リズムに基づいたHPの周期的な変動が無く、生涯冬眠を行うことができ
ない冬眠様式の種内変異(以下、非冬眠シマリス)の存在も明らかとなった(Kondo et al. 2006)。
この非冬眠シマリスが冬眠を行うことができない原因は今のところ明らかになってはいない
690 すが、HPの発現に明瞭な季節性が認められないことから、その調節能を失ったことに起因
すると考えられている。このシマリスの冬眠多型の発見により、これまでの冬眠研究で行わ
れてきた活動期と冬眠期というフェーズ間での比較や、遺伝的な背景が異なる種間での比
較ではなく、遺伝的な背景は同じであり、かつ冬眠調節の有無のみが異なる種内変異に基づ
くハプロタイプ間による比較が可能となった。この冬眠様式の多型を利用し、明確なHPの
概年リズムを持つ冬眠シマリスと概年的な代謝調節の変化がなく冬眠をしない非冬眠シマ
695 リス間の比較を行うことで、代謝調節の季節的な変化と冬眠調節との関わりを明らかにす
ることができると考えられる。

本研究の目的は、シマリスの冬眠に伴って起こるAMPKシグナル系の変化が、内因的な
概年リズムによって引き起こされるのかを明らかにすることである。本章では、冬眠期に活
性に変化するAMPKシグナル系に着目し、自然日長条件下で飼育するシマリスの各組織に
700 おけるAMPKシグナル系の季節変化を冬眠シマリスと非冬眠シマリス間で比較する。

方法

供試動物と飼育条件

本研究では、供試動物としてシベリアシマリス *Tamias sibiricus* が用いられた。使用した
705 シマリスはいずれの個体も(株)アークランドサカモトから購入した。実験に用いた全ての
個体は、23°C、12L:12D(Light:Dark)の明暗条件下において、木製チップ(道央理化学業、
札幌)を敷き詰めたゲージ(22cm×43cm×20cm)で個別に飼育し環境に順化させた後に、
後述する実験に用いるために5°C・恒暗条件下の低温室に移動させ、冬眠タイプと非冬眠タ

710 イプのスクリーニングを行った。また、非冬眠タイプのシマリスは冬眠を行わないことから、活動期と冬眠期の判断が 5°C 恒暗条件では判断ができないため、季節的な外環境の推移で体の状態が活動期と冬眠期とわかるように、冬眠多型のスクリーニング後、日長と気温の条件が外部の自然環境と同様な自然日長条件下でもシマリスの飼育を行った。すべての供試動物は、標準的なネズミ用飼料（MF、オリエンタル酵母工業株式会社）および水が与えられ、それぞれを自由に摂取できる状態で飼育された。5°C恒暗条件下では、シマリスの冬眠状態の有無の評価のために、1日1回 16:00~21:00 の間に、赤外線照射温度計（HORIBA. Ltd）を用いて表面体温を測定した。冬眠状態の個体は、表面体温が 10°C以下の時に冬眠状態にあることが分かっているので、ここでは 10°Cを閾値とし、冬眠状態と判断した(鎌田博士論文 2020)。

720 すべての動物実験は、動物実験倫理委員会により審査され、新潟大学学長により承認された動物実験計画に沿って実施された(承認番号「NiigataUniv.SA00738」)。実験のプロトコルは「Guiding Principles for Care and Use of Laboratory Animals」（米国 NIH）に準拠して行われた。

自然日長条件における冬眠シマリスおよび非冬眠シマリスの採材

725 ・冬眠シマリスと非冬眠シマリスの判別

組織採材・実験に際して、冬眠シマリスと非冬眠シマリスを分別する必要があるが、外部形態では冬眠多型の判別ができないため、5°C恒暗条件下における毎日の体温モニタリングによる冬眠の有無の確認によって、冬眠シマリスと非冬眠シマリスを判別した。非冬眠タイプのシマリスは、概年的な周期を持って冬眠を行う冬眠タイプと比べて、生涯冬眠に入ることがない(図 3-1a)。また、低体温にならないだけでなく、血中 HP 量に周期性がないことがわかっており(図 3-1b)、これにより季節的な冬眠調節が作動していない可能性が高い。シマリス個体の冬眠多型は、5°C・恒暗条件下における体温測定の開始から 190 日の体温モニ

タリングで95%の確率で判別できることが明らかとなっているため(鎌田 博士論文 2020)、本研究では、200日を越える体温モニタリングによる冬眠の有無の確認により、冬眠シマリスと非冬眠シマリスを分別し(図3-2)、以降の実験に用いた。

・自然日長条件下における冬眠シマリスおよび非冬眠シマリスの採材

非冬眠タイプのシマリスは冬眠を行わないため、年間を通じて一定の環境下では、冬眠タイプが示す活動期と冬眠期にあたる期間を判別することができない。そのため、冬眠多型の判別後、冬眠タイプと非冬眠タイプのいずれのシマリスも外環境によって夏期と冬期が判別できる自然日長条件下において飼育し、夏期(6月~7月)と冬期(12~2月)それぞれの時期で採材が行われた。自然日長条件下における冬眠シマリスの採材は、非冬眠の採材時期に合わせて、夏期における体温が高い時期と、冬期における低体温の時期に行った。自然日長条件下における非冬眠シマリスおよび冬眠シマリスには、腹腔内に防水コーティングを行った温度データロガーを埋め込み、採材を行うまで深部体温を記録した。

745

組織の採材方法およびタンパク質の定量

実験に供試したシマリスは、二酸化炭素ガスを用いた麻痺状態の後に断頭された。頭部を開頭し脳が取り出され、氷上で大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部の、部位ごとに分けられた。また、開腹後、肝臓、腎臓、筋肉、心臓の抹消の臓器も採材された。採材された組織はドライアイスで凍結後、解析まで-80°Cで凍結保存された。

凍結保存された各組織は重量を計測した後、氷上で組織重量の10倍量のLysis Buffer(2%SDS、62.5mM Tris-HCl(pH6.8))、蛋白分解酵素阻害剤(Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche Applied Science Ltd.)、脱リン酸化酵素阻害剤(PhosSTOP; Roche Applied Science Ltd.)を用いてホモジェナイズされた。ホモジェナイズした溶液を遠心分離し(15,000rpm×60min)、上清を試料とした。試料の一部をDC Protein Assay(Bio-Rad Ltd.)と混合し15分間反応させた後、MICRO PLATE READER(BIO-RAD Ltd.)を用いて含有タンパク質量を定

755

量した。残りの試料は Sample Buffer (2M Tris-HCl (pH6.8)、10%SDS、グリセロール、Bromophenol Blue、2-mercaptoethanol) と混合し、解析に用いるまで-30°Cで凍結保存された。

760 血糖値の測定

血糖値の測定は、血糖値自己測定機 (Freestyle Freedom, NIPRO) を用いて行われた。凍結保存されていた血液を氷上で融解させた後、0.3 μ l 程の血液を測定に用いた。

ウェスタンブロッティング

- 765 組織中の各タンパク質の発現量は、ウェスタンブロット法によって以下の手順で検出された。試料は、タンパク量が1ウェルあたり30または50 μ gになるように調整した後、10%または7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により泳動した。電気泳動後のゲルをPVDFメンブレンへ転写し、10%BSA (ALBUMIN BOVINE (SIGMA) / TNT (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.4, 0.05%Tween-20)) を用いてブロッキングした。その後、一次抗体として、
- 770 AMPK に対しては AMPK Antibody (CST ジャパン)、P-AMPK に対しては Phospho-AMPK α (40H9) Rabbit mAb (CST ジャパン)、ACC に対しては ACC Antibody (CST ジャパン)、P-ACC に対しては Phospho-ACC antibody (CST ジャパン)、eEF2 と P-eEF2 に対しては Inamura *et al.* (2005) で作成された抗体を、いずれも 1:1000 (抗体:TNT) の濃度で希釈し、オーバーナイトで反応させた。また、ローディングコントロールとして β -Actin を検出する
- 775 ために、一次抗体として Mouse Anti Actin Monoclonal Antibdy (Chemicon Co.) を用いて、オーバーナイトで反応させた。一次抗体を TNT を用いて洗浄した後、ウサギ由来の抗体に対しては Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunogloblins/HRP (DakoCytomation) を、マウス由来の抗体に対しては Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Inc.) を二次抗体としていずれも 1:10000 の濃度で希釈し、1時間室温で反応させ
- 780 た。抗体反応終了後、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) を用いて化学発光させ、X

線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM) に感光させることによりタンパク質の発現量をバンドとして検出した。

検出されたバンドのシグナルは、スキャナーで取り込みデジタル化され、ImageJ を用いた画像解析によってバンドの濃さが数値化された。算出された値は、いずれも活動期の発現量の平均値を 100%としたときの相対値として表された。

統計解析

すべての値は平均値±標準偏差で表された。データの分布が正規分布の時には学生t検定を用いて統計的な有意性を求めた。データが正規分布しないときには Wilcoxon rank sum test を用いて統計的な有意性を求めた。本研究では、p 値が 0.05 未満のときを有意差があるとした。

結果

冬眠タイプおよび非冬眠タイプの血糖値の季節間比較

グルコースは AMPK の主要な制御因子であるため、冬眠タイプと非冬眠タイプそれぞれで、活動期と冬眠期の血糖値が測定された (図 3-3)。冬眠タイプのシマリスの血糖値は、活動期が 183.4 ± 50.9 mg/dL、冬眠期は 82.4 ± 10.3 であり、冬眠期に有意に低下していた (wilcoxon rank sum test, $W=23$, $p=0.03$)(図 3-3a)。また、非冬眠タイプのシマリスの血糖値では、活動期が 243.4 ± 50.7 mg/dL、冬眠期に 186 ± 17.9 であり、活動期と冬眠期で有意な差は見られなかった (wilcoxon rank sum test, $W=21$, $p=0.62$)(図 3-3b)。このことから、冬眠中のシマリスでは、エネルギー状態が低下していることが考えられたが、非冬眠タイプにおいては、活動期と冬眠期で体のエネルギー状態に大きな変化がないと考えられた。

805 冬眠タイプと非冬眠タイプにおける AMPK シグナル系タンパク質の発現量の季節的变化

AMPK の活性化状態を反映するリン酸化 AMPK (Thr172) 量を、活動期および冬眠期のシマリスの 5 つの脳の領域と 4 つの末梢組織でウェスタンブロッティング法により調べ、その季節的な変化を冬眠タイプと非冬眠タイプで比較した。結果として、自然日長条件下で飼育した冬眠タイプの脳組織においては、すべての脳の部位で AMPK のリン酸化が活動期
810 と比較して、冬眠期で亢進していた(冬眠タイプ: 大脳皮質-リン酸化 AMPK : t-test, $t=11.844$, $p<0.001$, 海馬-リン酸化 AMPK: t-test, $t=5.22$, $p<0.001$, 間脳-リン酸化 AMPK: t-test, $p<0.001$, 小脳-リン酸化 AMPK: t-test, $t=3.46$, $p<0.001$, 視床下部-リン酸化 AMPK: t-test, $t=3.79$, $p=0.006$) (図 3-4, 3-5)。図 3-4 に、間脳で得られたウェスタンブロッティングのシグナルの図を例として示した。なおウェスタンブロッティングで得られたすべての組織におけるシグナルの図は付
815 録 3-1, 3-2 に示した。一方で、非冬眠タイプにおいては、海馬のみで冬眠期における AMPK のリン酸化が亢進していた(非冬眠タイプ: 海馬-リン酸化 AMPK: t-test, $t=2.58$, $p=0.03$) (図 3-5)。同様に、AMPK の直接のリン酸化を受ける下流のシグナル因子の ACC に関しても、冬眠タイプのすべての脳組織で、リン酸化 ACC の発現量が活動期から冬眠期にかけて亢進していた(冬眠タイプ: 大脳皮質-リン酸化 ACC : t-test, $t=5.00$, $p=0.001$, 海馬-リン酸化 ACC: t-test,
820 $t=8.43$, $p<0.0001$, 間脳-リン酸化 ACC: t-test, $t=3.47$, $p=0.008$, 小脳-リン酸化 ACC: Wilxon rank sum test, $W=0$, $p=0.007$, 視床下部-リン酸化 ACC: t-test, $t=3.65$, $p=0.007$)。一方、非冬眠タイプにおいては、海馬のみで ACC のリン酸化が亢進していた(海馬, $t=3.91$, $p=0.003$) (図 3-7)。さらに、ACC と同様、AMPK のシグナル系の下流に位置し、リン酸化されることで抑制され、タンパク質合成の翻訳が抑制される eEF2 のリン酸化についても、脳では、小脳を除いて冬眠タイプ
825 には亢進されていた(大脳皮質-リン酸化 eEF2 : t-test, $t=2.47$, $p=0.04$, 海馬-リン酸化 eEF2: Wilcox rank sum test, $W=4$, $p=0.09$, 間脳-リン酸化 eEF2: t-test, $t=8.48$, $p<0.001$, 視床下部-リン酸化 eEF2: t-test, $t=5.04$, $p=0.001$) (図 3-9)。一方で、非冬眠タイプのシマリスの脳においては、冬眠タイプで見られた脳の各組織における AMPK の活性化は認められず、海馬のみ

で、AMPK が活動期から冬眠期にかけて活性が亢進することが明らかとなった。

830 冬眠タイプの末梢組織においては、冬眠期に血糖値が減少していたものの、AMPK のリン酸化の亢進が見られた組織はなく、とりわけ肝臓では、AMPK のリン酸化量が活動期と比較して、冬眠期に減少する傾向が見られた(冬眠タイプ：肝臓リン酸化 AMPK, Wilxon rank sum test, $W=22$, $p=0.055$)(図 3-5)。同様に、非冬眠タイプの末梢組織においても、AMPK の有意な活性化は見られなかった。AMPK の下流のシグナル因子においては、冬眠タイプの腎
835 臓で ACC のリン酸化が、腎臓と筋肉で eEF2 のリン酸化がそれぞれ活動期と比較して有意に増加していた(冬眠タイプ：腎臓リン酸化 ACC : t-test, $t=5.89$, $p<0.001$, 腎臓リン酸化 eEF2: t-test, $t=9.81$, $p<0.001$, 筋肉リン酸化 eEF2: t-test, $t=2.87$, $p=0.02$)(図 3-7)。その一方、非冬眠タイプの末梢組織では、活動期と比較して冬眠期にリン酸化が有意に増加した AMPK の下流シグナル系のタンパク質は認められなかった (図 3-9)。

840

考察

本研究では、冬眠の代謝調節メカニズムを明らかにする一環として、自然日長条件下で冬眠シマリスと非冬眠シマリスにおいて AMPK の活性が季節間で変化するかを調べ、冬眠多型間で比較した。結果として、自然日長条件下における冬眠タイプのシマリスの脳組織では、
845 AMPK のリン酸化が冬期に亢進し活性化していたのに対して、非冬眠シマリスでは海馬を除き、上述した変化は見られなかった。また、AMPK によってリン酸化され抑制されると考えられているリン酸化 ACC およびリン酸化 eEF2 の亢進も冬眠期のシマリスでは各脳組織で起きていたが、非冬眠シマリスではリン酸化の亢進が起きていなかった。一方で、末梢組織では、冬眠タイプと非冬眠タイプいずれも、AMPK のリン酸化は亢進していなかった。以
850 上から、冬眠タイプのシマリスにおいては、活動期と比較して冬眠期に中枢組織における AMPK の活性が上昇する傾向が見られたが、非冬眠タイプのシマリスでは、AMPK 活性化が冬眠期に入っても起らず、冬眠期における代謝調節の季節的変化が非冬眠タイプでは起

きていないことが明らかとなった。これらの結果を受けて、考察では、はじめに、脳内において冬眠期に起こる AMPK の活性化が冬眠期特異的に起こる現象なのかを 2 つの飼育条件
855 におかれた冬眠シマリスの応答から考察し、次いで、脳内において起こる AMPK の季節的
変化がどのような要因で起こるのかについて考察する。最期に、以上の考察を受けて、今後
AMPK が冬眠の調節の下で機能するタンパク質であることを示すためには、どのような検
証が必要なのかについて議論する。

860 ・脳内における AMPK の活性化は冬眠期に特異的に起こる現象なのか？

本研究で得られた、自然日長条件下における冬眠タイプの AMPK シグナル系の季節間比較
の結果は、2 章で述べた 5°C・恒暗条件下における AMPK シグナル系の応答と同様であっ
た。5°C・恒暗条件下における冬眠期の脳内では、活動期と比較して、特に大脳皮質と間脳
で AMPK シグナル系の活性が有意に上昇していた。一方で、海馬、小脳、および視床下部
865 では、AMPK のリン酸化量に季節間の統計的な差異は見られなかったが、活動期から冬眠
期にかけて AMPK のリン酸化量自体は上昇していた。それに加え、AMPK の下流のシグナ
ル系である ACC や eEF2 のリン酸化の変化を、AMPK の発現量の上昇傾向と併せて考える
と、AMPK の活性は活動期から冬眠期にかけて脳組織全体で上昇していることが明らかと
なった。一方、自然日長条件下における冬眠タイプの活動期と冬眠期間での AMPK シグナ
870 ル系のリン酸化量の比較では、すべての脳組織において AMPK シグナル系のリン酸化量が
有意に上昇しており、それに対応して、下流のシグナル系の因子もリン酸化が亢進していた。
末梢組織では、肝臓において AMPK のリン酸化量の減少が見られたものの、それ以外の組
織では AMPK の活性に季節的变化は認められず、それは 5°C・恒暗条件下および自然日長
条件下のいずれの暴露条件においても同様であった。冬眠期における肝臓のリン酸化量の
875 減少や他の末梢組織における AMPK 活性に冬眠期特異的な変化が見られないことは他の冬
眠動物でも報告されている。例えば、ジリスの肝臓では活動期から冬眠期にかけて AMPK

活性の低下が認められた一方(Horman et al. 2005)、筋肉組織では AMPK 活性の変化が季節間で変化しないこと(Horman et al. 2005, Healy et al. 2011)が報告されており、今回得られたシマリス末梢組織における AMPK の活動期と冬眠期での反応は、冬眠動物に共通したものと考
880 えられる。一方で、脳内における AMPK 活性に関する報告はこれまでになく、活動期から冬眠期にかけて脳内における AMPK 活性の変化が報告されたのは本研究が初めてになる。これらのことから、2 章で説明した 5°C・恒暗条件下および本章の自然日長条件下での中枢組織における AMPK の活動期から冬眠期における季節的な変化は、少なくともシマリスの冬眠において見られる反応であると考えられる。

885

・冬眠期のシマリス脳内で起こる AMPK の活性化の原因は何か？

冬眠タイプのシマリスの脳において AMPK が冬眠に連動して活性化する要因として考えられることは、冬眠に伴う低体温や低血糖などを含めた体内環境の変化による亢進、もしくは内因的な概年リズムに支配された冬眠調節に起因した亢進の可能性が挙げられる。2 章の
890 5°C・恒暗条件の結果および本章の自然日長条件の結果のいずれにおいても、冬眠タイプは、活動期に比べ、冬眠期により低血糖になった。冬眠タイプにおいて、冬眠期に脳内で起きる AMPK の活性化が冬眠に併せて起こる体内環境の変化によって生じているとすると、低血糖による低エネルギーによる AMPK の活性化 (Kahn et al. 2005) や、低体温によっておこる Ca²⁺の動態 (Knight et al. 2015)、神経組織に蓄積されたエネルギー源の量などに起因する可
895 能性が考えられる。一方で、非冬眠タイプのシマリスにおいては、冬眠タイプとは異なり、冬眠期における脳内での AMPK 活性の亢進は起きていなかった。その原因として、非冬眠タイプのシマリスが明確な HP の概年リズムをもたず、冬眠できないことが関係している可能性もある。シマリスの冬眠は、冬期になると血中から脳内に HP が移行することで誘導される
900 ことがすでに知られている (Kondo et al. 2006)。非冬眠タイプのシマリスは、HP の季節的な周期性が消失しており、HP による冬眠調節が起きていないために冬眠できなくなって

いると考えられている (Kondo et al. 2006)。このことを踏まえると、冬眠シマリスと非冬眠シマリスにおける脳内での AMPK シグナル系の応答の違いは、内因的な概年リズムに支配されている冬眠調節によるものである可能性が高い。特に HP は、C1q ファミリーに含まれるタンパク質であり、さらにアディポネクチンと非常に高い相同性を持つことが知られている (Kondo and Kondo, 1992, Kishore et al. 2004)。AMPK は、アディポネクチンをはじめとした C1q ファミリーに属するいくつかのタンパク質によって活性化されることが知られており (Kubota et al. 2007, Lee et al. 2010)、AMPK の活性化に HP が直接関与している可能性もある。これらのことから、非冬眠シマリスが冬眠できず、冬眠期になっても AMPK の脳全体での活性化が見られないのは、AMPK の上位因子と考えられる HP が季節的周期性を消
905 失していることに起因している可能性が挙げられる。また、脳内における AMPK の活性化は、概年リズムのリズム形成に関与しているといわれているサイロキシンによっても起こるとされており (Ishii et al. 2008)、HP 同様、サイロキシンなどの概年周期に関係するようなホルモンも冬眠における AMPK の活性化に関与している可能性が考えられる。

915 ・今後の展望

本章では、冬眠タイプと非冬眠タイプの比較を通して、活動期と比較して冬眠期で起こるシマリス脳内における AMPK の活性化が HPなどを介した概年リズムによって引き起こされる可能性を示してきた。その一方で、低体温による冬眠の副次的な影響によって AMPK 活性に変化が起こる可能性も否めない。これらを明確にするためには、冬眠の低体温状態の
920 影響を排した、冬眠するために必要な体の変化として、AMPK の活性の変化が起きていることを抽出する必要がある。このような問題は、これまでの冬眠研究でも課題とされてきており、この課題をクリアするために着目されているのが「冬眠移行期」に起こる体の変化である。冬眠動物は冬眠期になると体を調節し、冬眠の著しい低体温低代謝に耐えるために、体を作り変えることといわれている (Chayama et al. 2019)。この体の作り変えは、冬眠の低体

925 温に併せて起こるのではなく、季節的な調節の下で冬眠する前の体温が高い状態で起こると考えられている(Grabek et al. 2015, Chayama et al. 2019)。例えば、シリアンハムスターでは、冬眠前に白色脂肪組織で脂質の同化や異化に関する遺伝子の発現量が上昇することや、ジリスの心臓では、冬眠に伴い変化する遺伝子がある一方、脂肪輸送に関わる遺伝子などは冬眠前から発現量が変化することが報告されている。また、シマリスの心臓では、冬眠移行
930 期には、活動期にはなかった低体温への強い耐性があることが報告されている (Kondo and Shibata 1984)。これらのことから、冬眠に必要な体内調節は、冬眠移行期からすでに起きている可能性が高く、冬眠期におこるシマリス脳内での AMPK 活性化が概年リズムに基づく冬眠調節によって起きているのであれば、冬眠移行期から AMPK の活性化が始まっている可能性が高い。冬眠期に見られたシマリス脳内で起こる AMPK の活性化が、低体温や低血
935 糖などの影響によるのか、概年リズムに基づく冬眠調節の下で起こる変化なのかを判別するには、冬眠移行期における AMPK シグナル系の応答を明らかにすることが一助になるであろう。

940

945

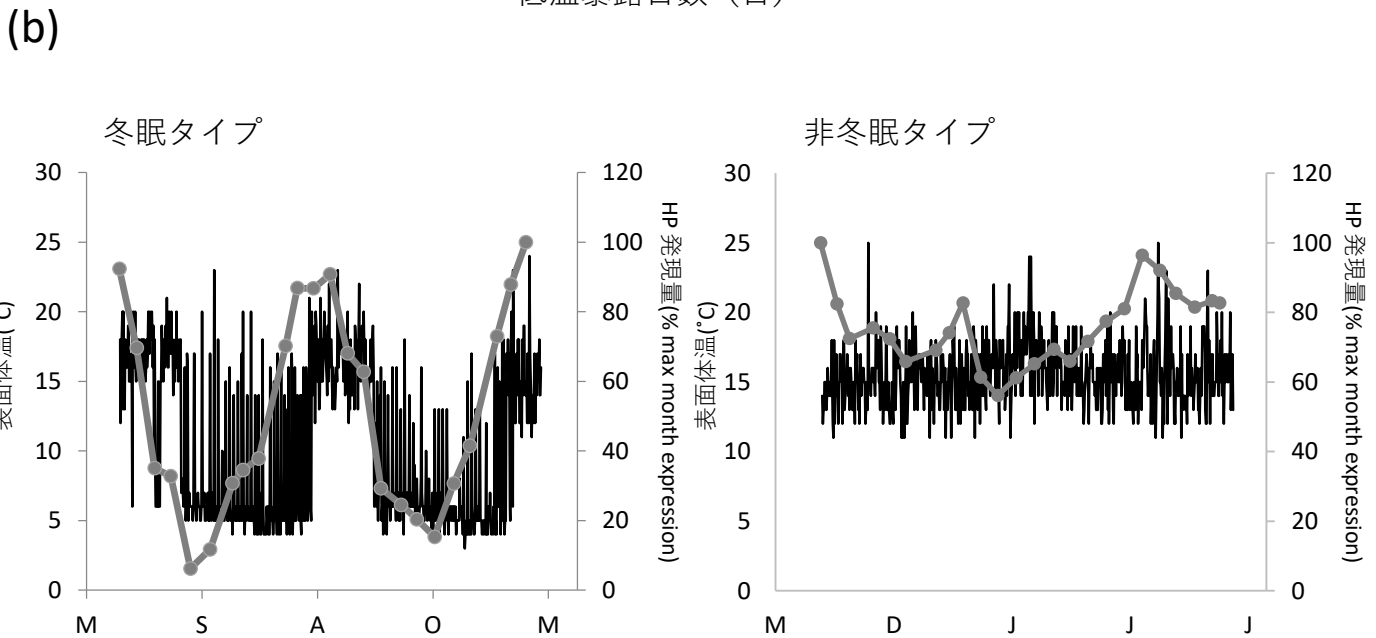
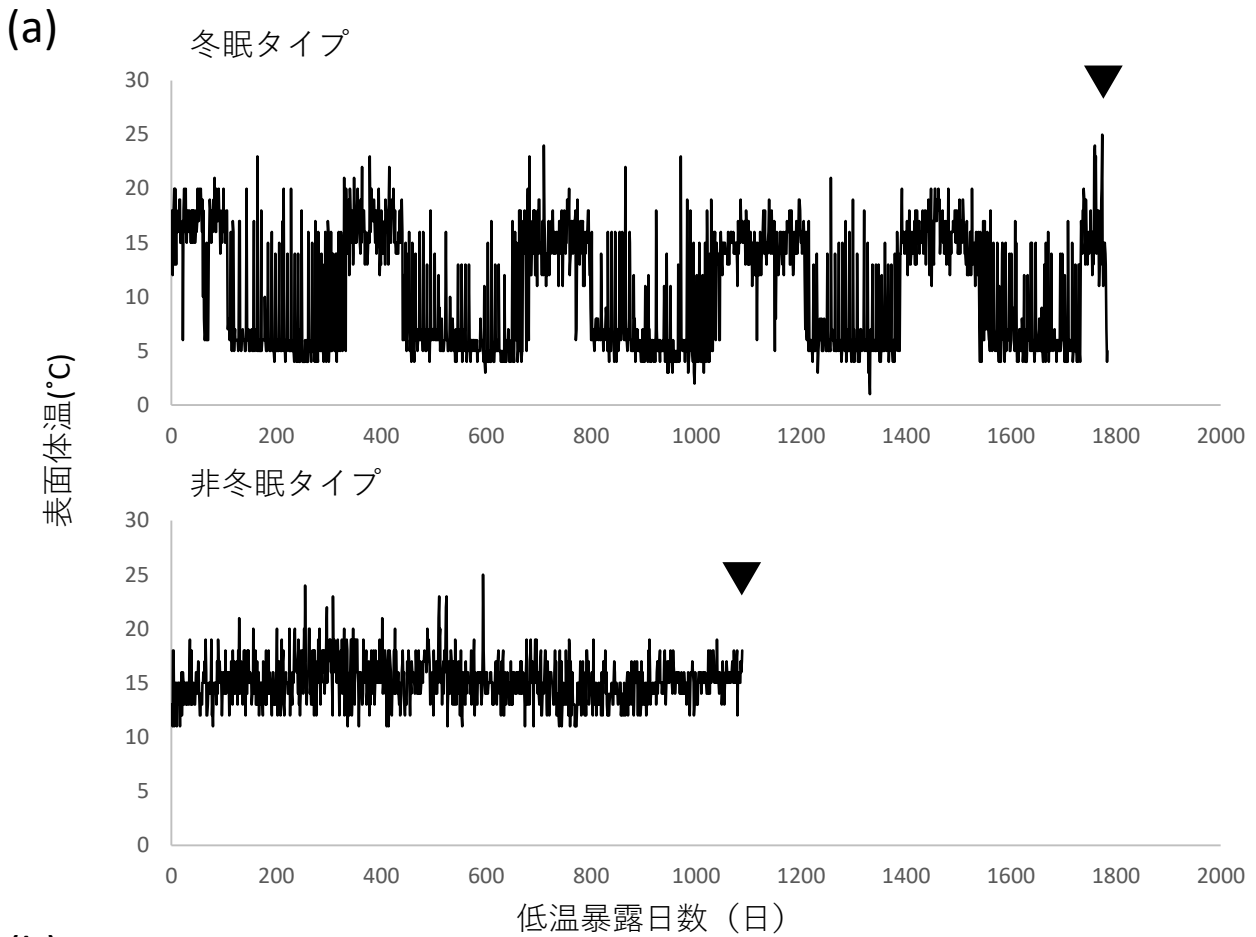


図3-1. 冬眠における年周リズムの冬眠タイプと非冬眠タイプの違い.

(a)は冬眠タイプのシマリスと非冬眠タイプのシマリスの5°C恒暗条件下における生涯に渡る表面体温の推移を示している。▼は、供試個体が死亡したことを示している。冬眠タイプは年周期的に冬眠を繰り返すが、非冬眠タイプは死亡するまで冬眠を示さない。

(b)は冬眠タイプと非冬眠タイプのシマリスの表面体温の推移と血中HPの濃度の推移を示している。黒線は表面体温を、灰色の線はHPの相対的な血中濃度を表している。冬眠タイプは、冬眠の周期に合わせて血中HPが大きく変動するが、非冬眠タイプは低体温を示さず、HPの大きな変動も見られなかった。

(a) 冬眠タイプ

(b) 非冬眠タイプ

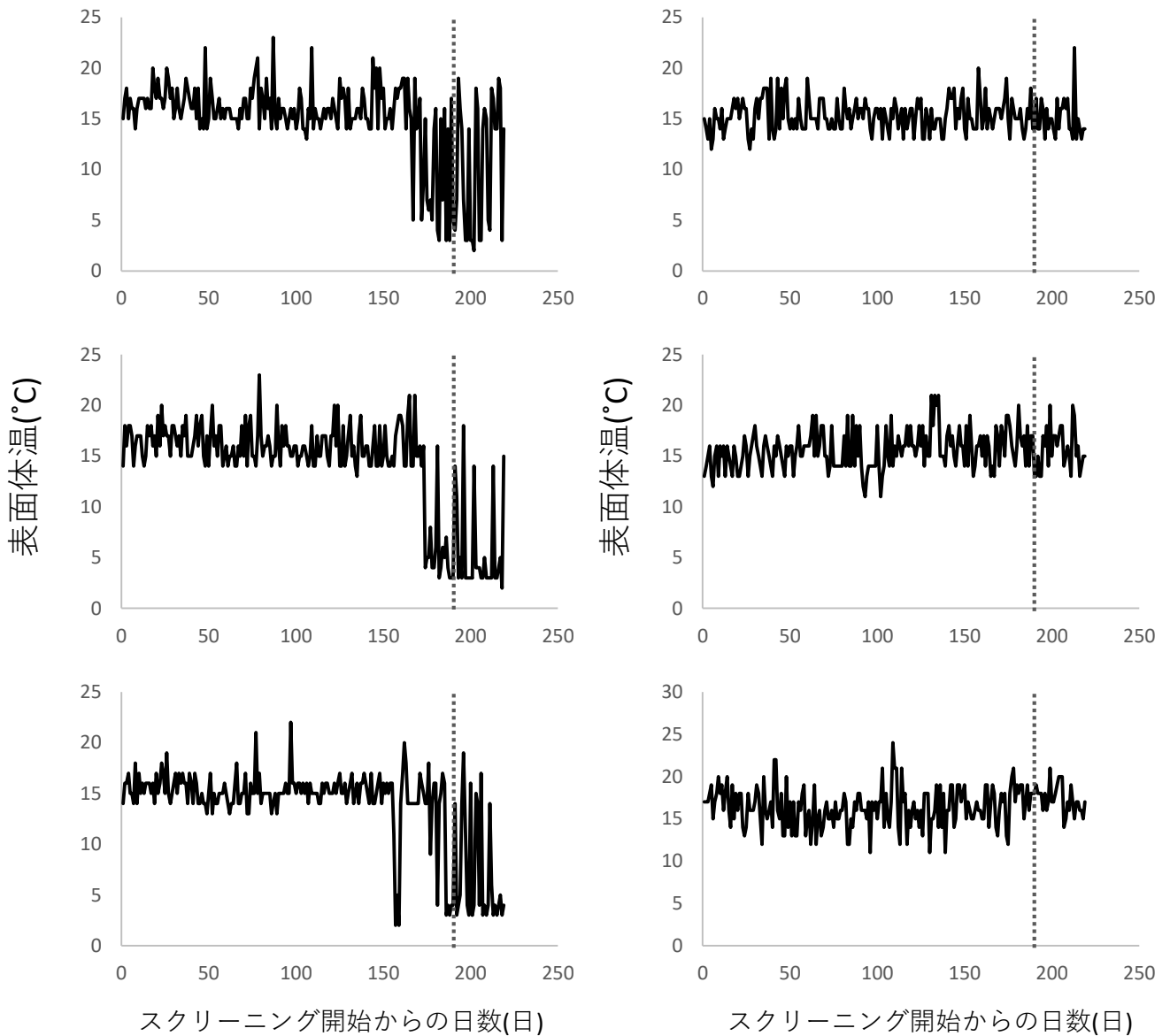


図3-2.冬眠タイプと非冬眠タイプを判別するための体温を用いたスクリーニング.

(a)は冬眠タイプの、(b)は非冬眠タイプの判別を行うために、5°C恒暗条件下で測定された表面体温の推移を示している。黒線はシマリスの表面体温を、破線は、以前の研究(鎌田 未発表)で冬眠タイプと非冬眠タイプを判別するのに必要日数の190日目を示している。190日より前に低体温を示した個体を冬眠タイプ、190日を越えても低体温を示さない個体を非冬眠タイプとして実験に用いた。

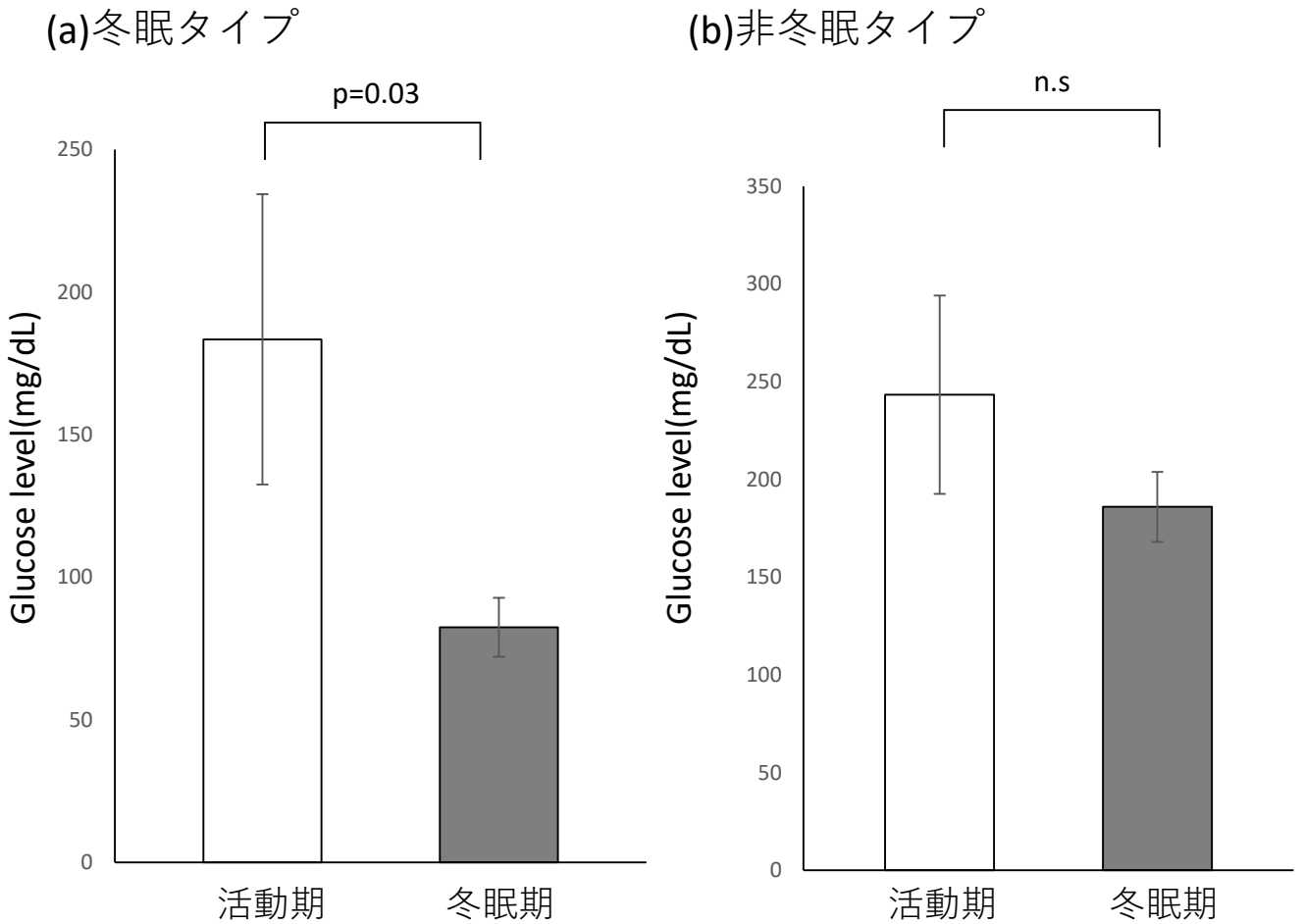


図3-3.冬眠タイプと非冬眠タイプを判別するための体温を用いたスクリーニング.
 血糖値は、活動期 (white bar,冬眠タイプn=5,非冬眠タイプ,n=5) と冬眠期(grey bar,冬眠タイプn=5,非冬眠タイプn=7)においてそれぞれ採取された血液を用いて測定された。(a)は冬眠タイプ、(b)は非冬眠タイプの血糖値を示している。グラフの値は平均値±SEで表される。 *p<0.05 (Student's t-test)

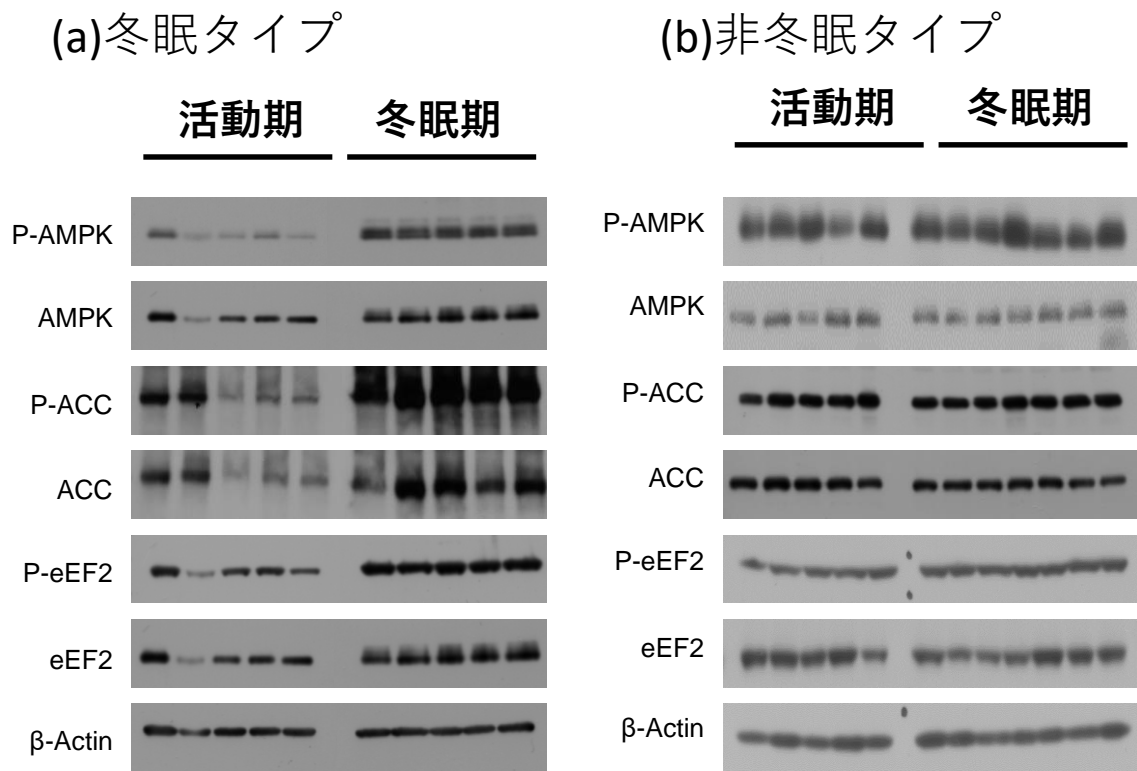


Fig.3-4 間脳におけるAMPKシグナル系の発現量.

(a)は冬眠タイプ、(b)は非冬眠タイプの間脳におけるWestern blottingによって検出された各タンパク質のバンドを示している。各タンパク質の発現量はWestern blotting法を用いて定量化された。

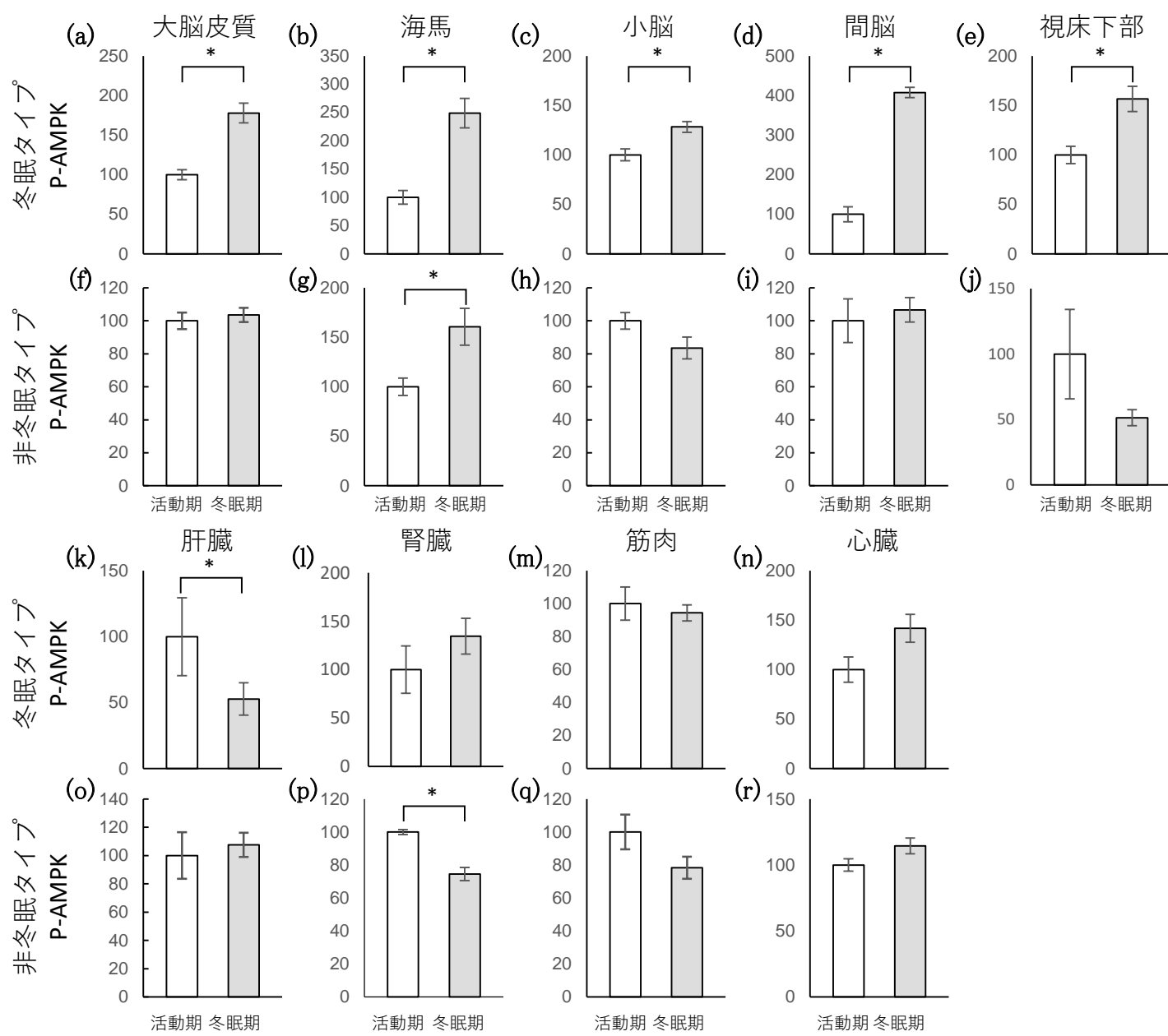


図3-5.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるリン酸化AMPKの発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(j); 冬眠タイプP-AMPK, (a~e,k~n); 非冬眠タイプAMPK, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=5,非冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=7)。*p<0.05 (wilcox rank sum test (k)またはstudent' t-test (残りすべて))。

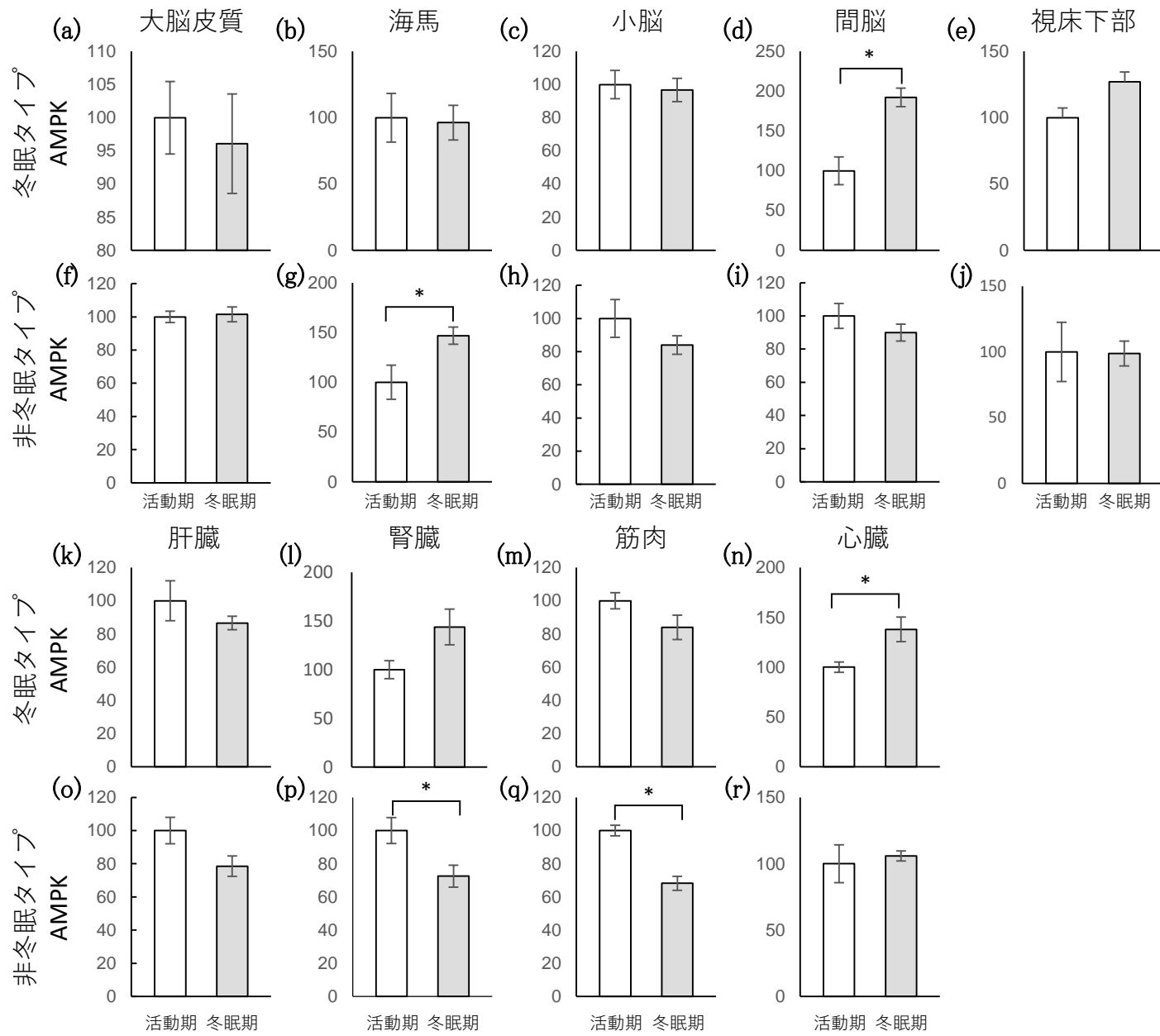


図3-6.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるtotal-AMPKの発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(); 冬眠タイプAMPK, (a~e,k~n); 非冬眠タイプAMPK, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ: 活動期n=5,冬眠期n=5, 非冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠期n=7)。*p<0.05 (student' t-test)。

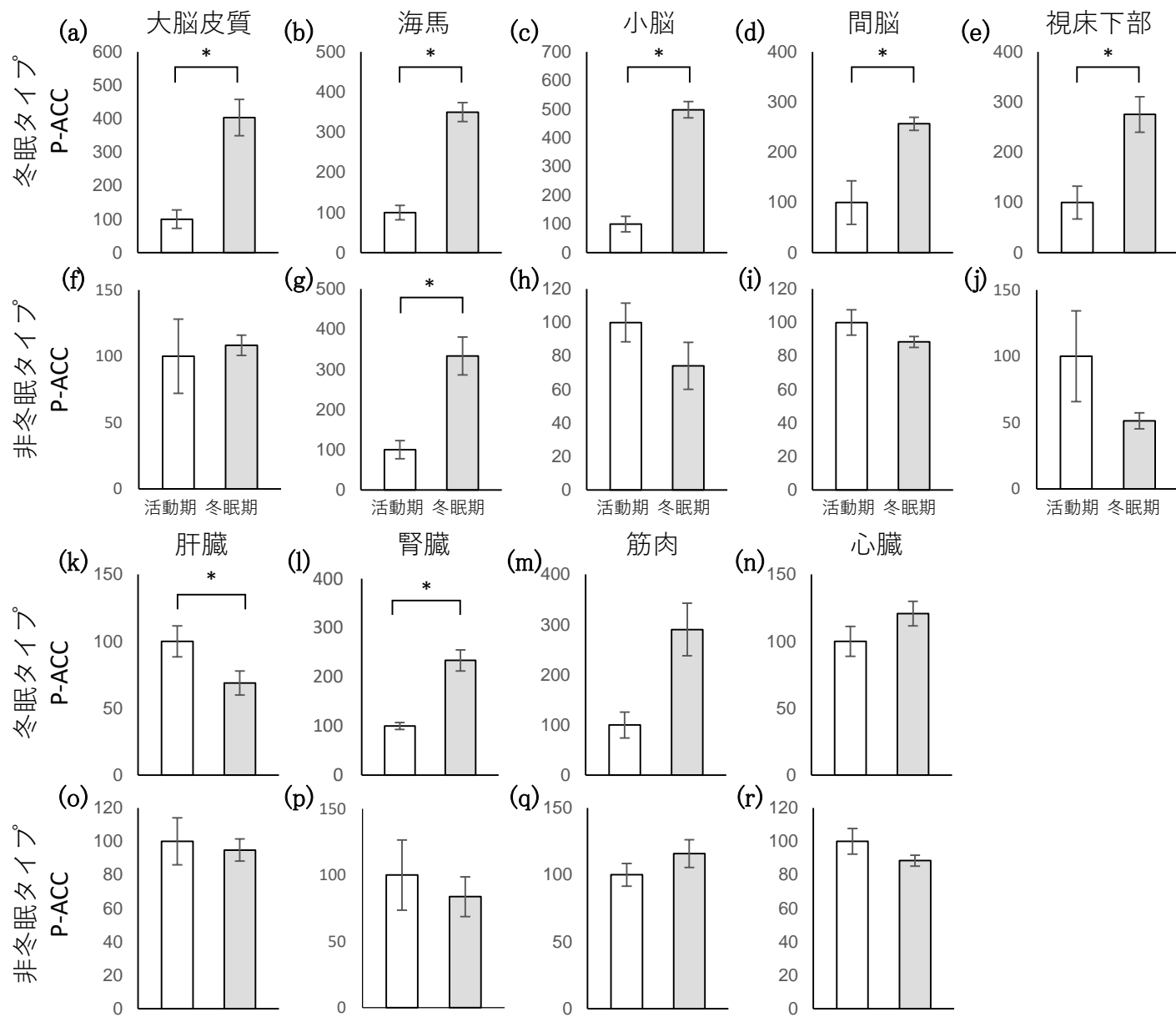


図3-7.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるリン酸化ACCの発現量の活動期と冬眠期の比較。

活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウエスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(j); 冬眠タイプP-ACC, (a~e,k~n); ACC, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=5,非冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=7)。*p<0.05 (wilcoxon rank sum test (c) またはstudent' t-test (残りすべて))。

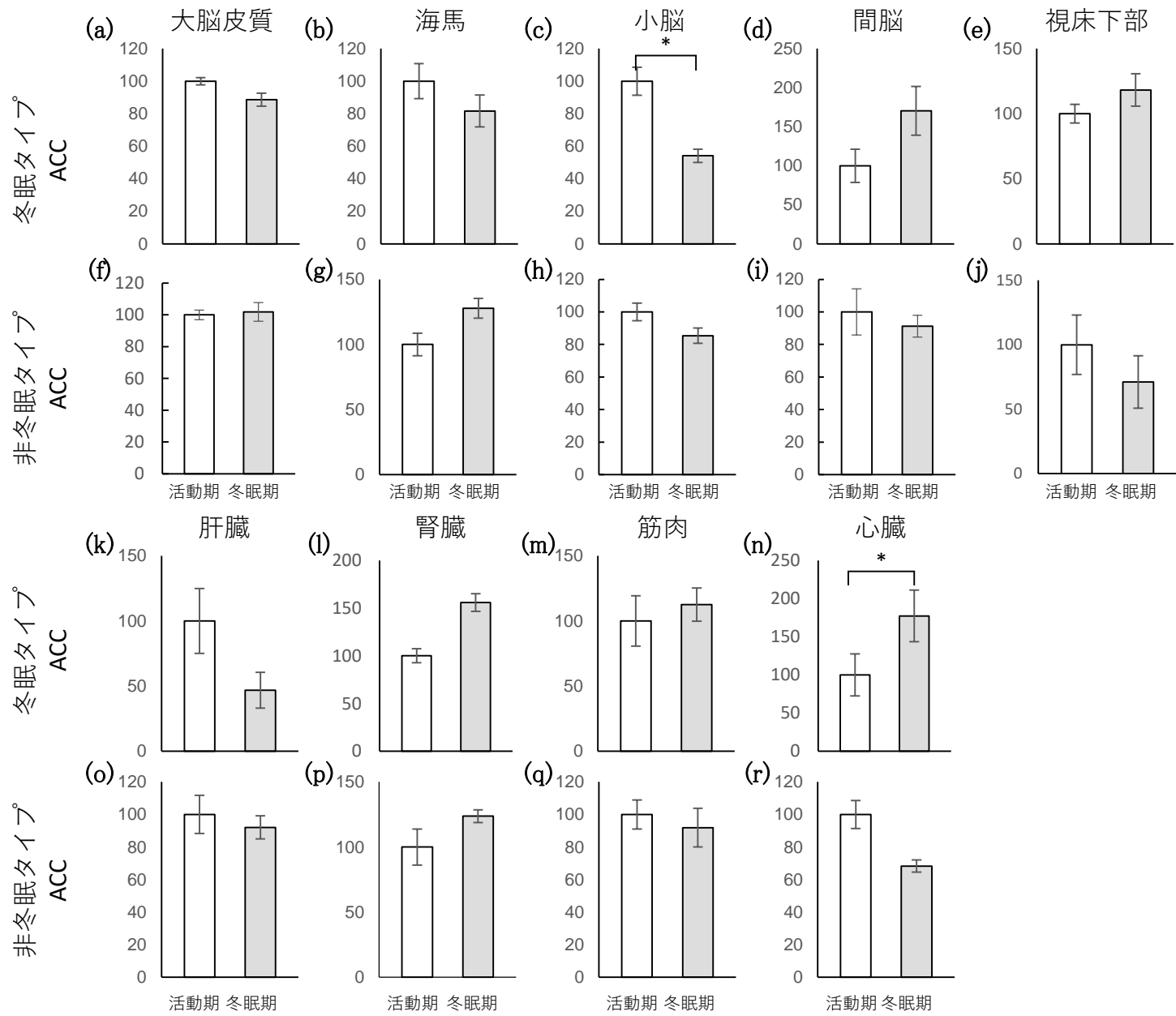


図3-8.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるtotal-ACCの発現量の活動期と冬眠期の比較。
 活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(); 冬眠タイプACC, (a~e,k~n); 非冬眠タイプACC, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=5,非冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=7)。*p<0.05 (student' t-test)。

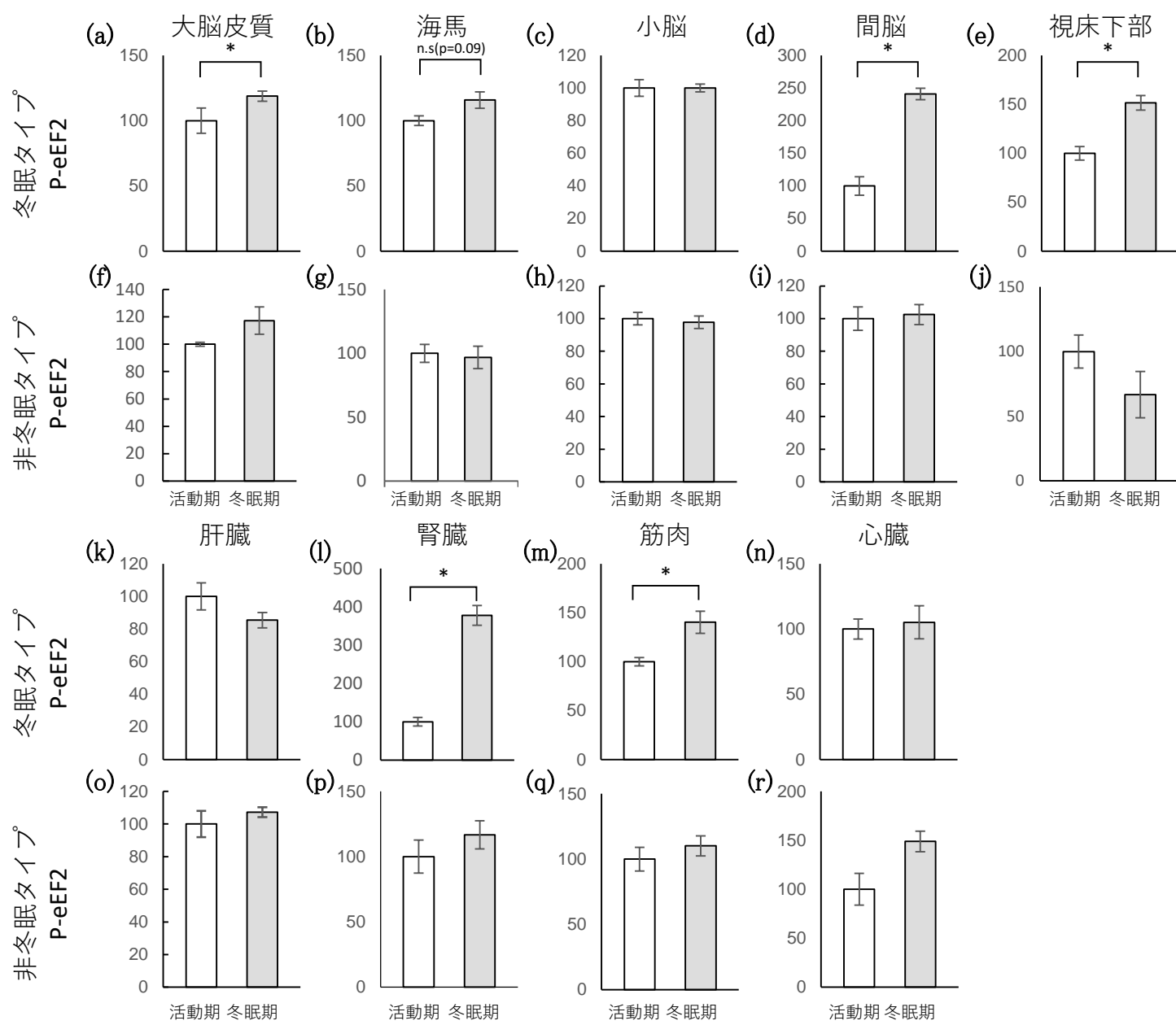


図3-9.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるリン酸化eEF2の発現量の活動期と冬眠期の比較。
 活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(j); 冬眠タイプ P-eEF2, (a~e,k~n); 非冬眠タイプ p-eEF2, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠期n=5, 非冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠期n=7)。*p<0.05 (wilcoxon rank sum test (b) または student' t-test (残りすべて))。

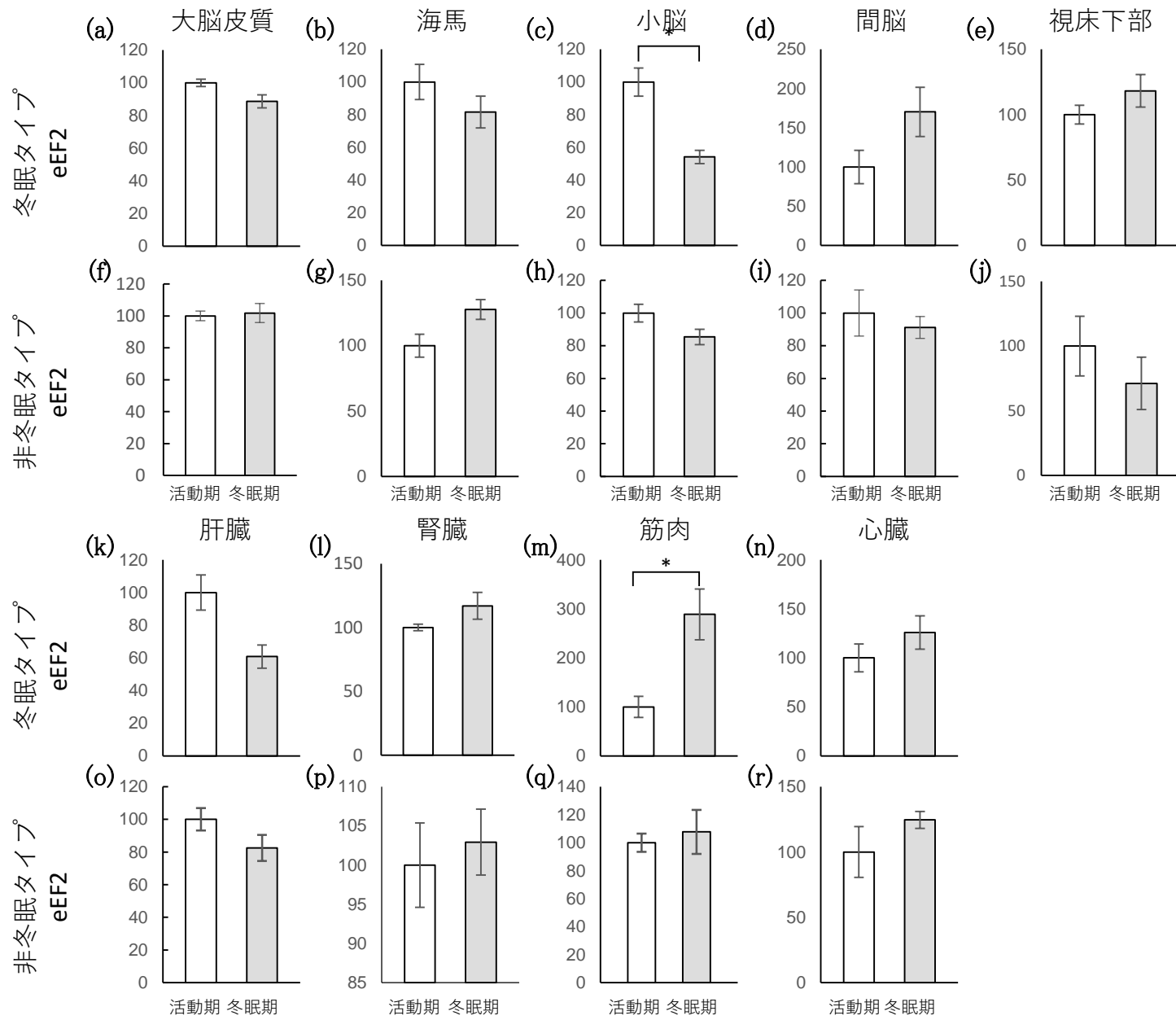
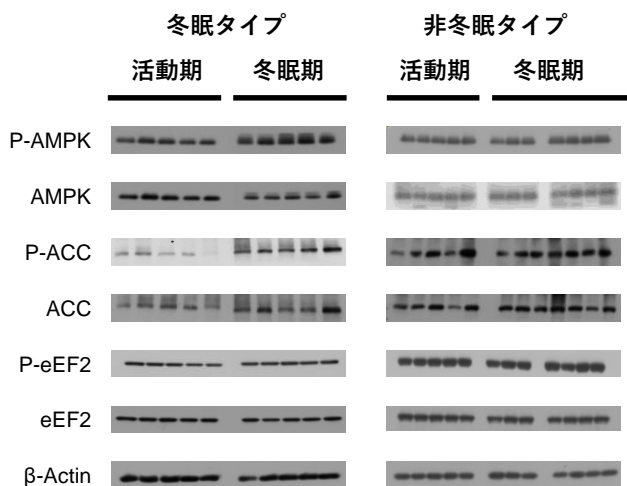
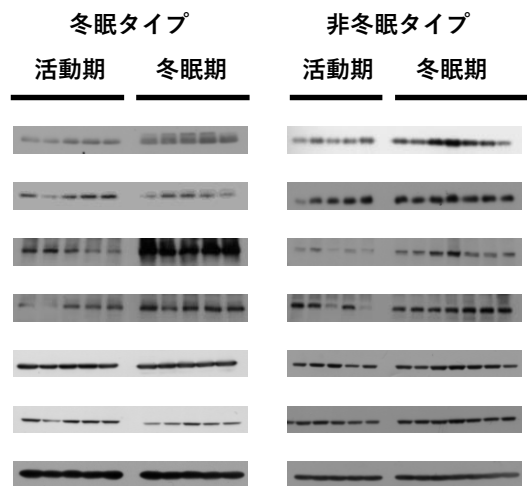


図3-10.冬眠タイプと非冬眠タイプの各組織におけるtotal-eEF2の発現量の活動期と冬眠期の比較。
 活動期と冬眠期のシマリスの脳組織(大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部)と末梢組織(肝臓、腎臓、筋肉、心臓)におけるAMPKのリン酸化量とトータル量をウェスタンブロッティングで測定し活動期と冬眠期の間で比較した。同じ組織内では、すべてのサンプルを同じゲルに泳動し、単一のメンブレンにブロッティングし、それぞれの条件のタンパク質の発現量を示した。(); 冬眠タイプeEF2, (a~e,k~n); 非冬眠タイプeEF2, (f~h,o~r)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=5,非冬眠タイプ:活動期n=5,冬眠期n=7)。*p<0.05 (student' t-test)。

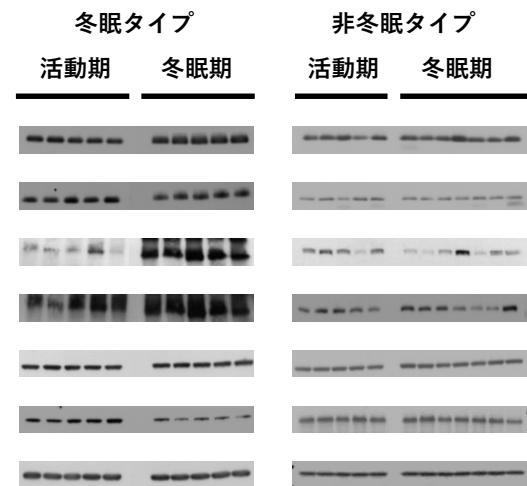
(a) 大脳皮質



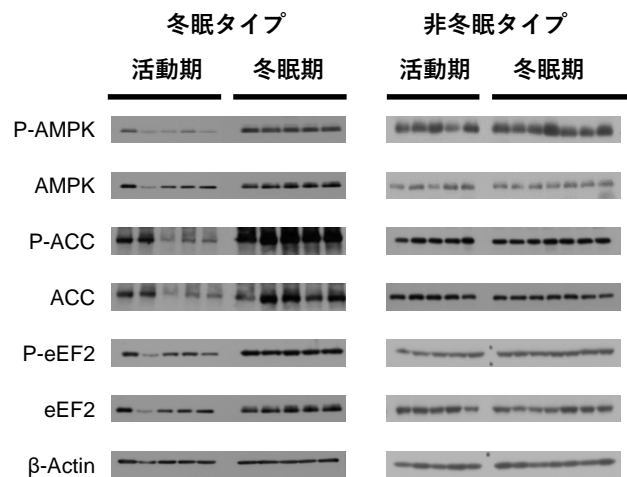
(b) 海馬



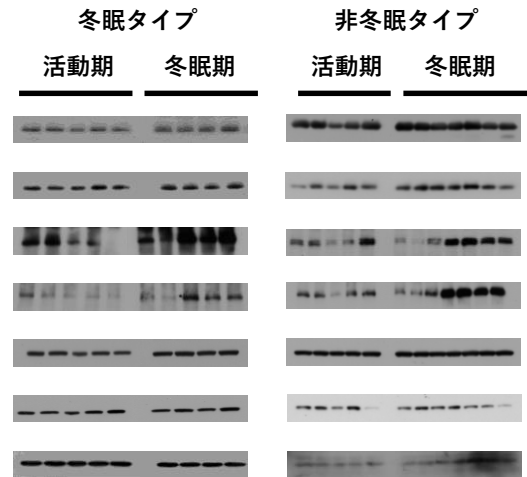
(c) 小脳



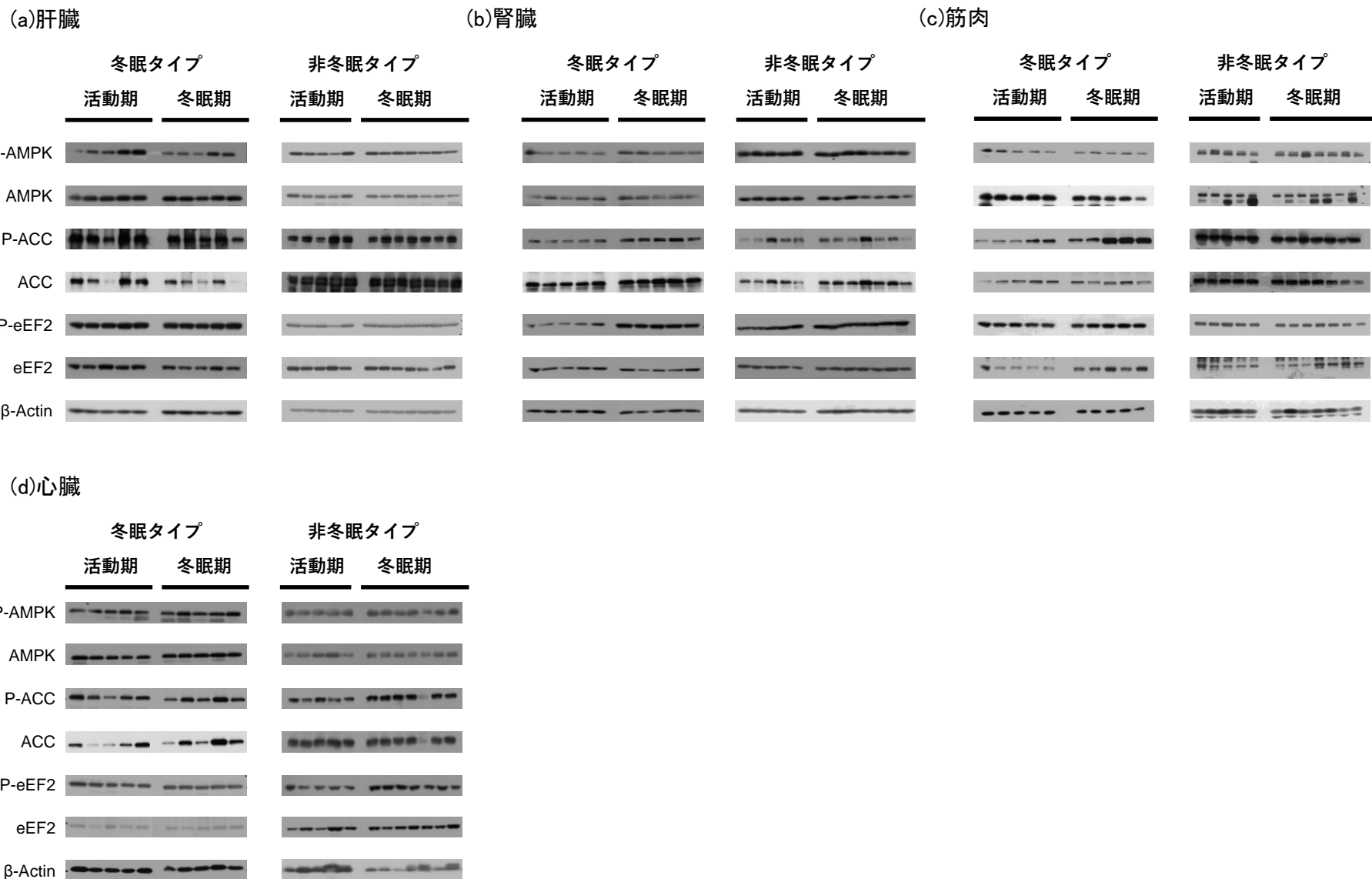
(d) 間脳



(e) 視床下部



付録.3-1 シマリスの各組織において行われたウェスタンブロッティングから得られたタンパク質の発現量



付録.3-2 シマリスの各組織において行われたウェスタンブロッティングから得られたタンパク質の発現量

950 4章. 冬眠シマリスの脳における AMPK 活性の冬眠前調節の評価と冬眠における AMPK 活性化の意義

はじめに

冬眠は、一部の哺乳類が能動的に体温や代謝を大幅に低下させる生理現象といわれている。一般的な哺乳類では生命の維持が困難になるほどの著しい生理状態の抑制が引き起こされているにも拘わらず、冬眠動物はその生活環の中で活動状態と冬眠状態を繰り返す。冬眠動物では、活動期と比較して冬眠期の体内において、低体温や低代謝状態に耐えるための様々な生理メカニズムが獲得されることがわかっており、その分子基盤への理解に向けて強い関心が寄せられてきた。これまでの冬眠研究の多くは、低代謝への調節や低体温誘導メカニズムの理解のために、体温が高い状態の活動期と体温が低下する冬眠期を比較して、特異的に発現量が増加する遺伝子やタンパク質を探索することで進められてきた (Storey and Storey, 2004)。例えば、キンイロジリスの肝臓において、血液凝固に関する α 2-macroglobulin や長鎖脂肪酸の代謝にかかわる apolipoproteinA1、また cathepsin H、チロキシン-bindingglobulin の mRNA の発現が冬眠期に増加することが既往の研究によって報告されている (Epperson and Martin, 2002)。しかしながら、これまでに数多くの体内因子が見出されているものの、それらの因子の機能や役割がどのように冬眠調節の分子的なメカニズムに関わっているのかは解明されていないことが多い。その理由としては、低い体温と高い体温での比較においては、その著しい生理状態の違いがノイズとなり、冬眠調節に重要となる生理的变化を検出することを困難にさせているためであると考えられている (Grabek et al. 2015)。

970 したがって、冬眠における代謝や体温の調節に関わる重要な因子を明らかにするためには、低体温などの体内環境に依存せずに、冬眠動物の季節的な調節のもとで起こる変化を抽出することが重要であることが考えられる。

このような問題を解決するために、Grabek ら (2015) は、冬眠の移行期に着目した研究の

重要さを指摘している。既往の研究から、冬眠動物は、年周的な体内リズムに従って、冬眠
975 する前から低体温・低代謝に耐性のある体に変化させていることが示されている。例えば、
冬眠動物であるジリスにおいては、低体温になる 45 日前から、徐々に一日の平均体温が低
下していくことや(Sheriff et al. 2012)、外気温が高いときでも、冬眠する時期が近づくと冬眠
前から体温低下を伴う浅い休眠状態を示すことが知られている(Russell et al. 2010)。また、ジ
リスでは、冬眠に併せて様々な組織で遺伝子発現の変化が生じることが報告されているが、
980 その遺伝子群は、冬眠における低体温に曝されてから始まるものと、冬眠による低体温が見
られる前の秋から冬期にかけての冬眠移行期から変化し始めるものとで分けられることが
示されている(Grabek et al. 2015)。さらにシマリスにおいては、冬眠開始前の通常の体温下で
起こる心筋の変化によって、冬眠期の低体温状態でも心臓の拍動が維持される機能を獲得
していることが報告されている(Kondo 1987)。これらの研究により、冬眠動物は、冬眠期の
985 前から低体温に耐えられるような調節系が作動していることが示唆され、冬眠期より前の”
冬眠移行期”における体の変化が、低体温・低代謝に依存しない、冬眠の調節に重要な変化
であると考えられる。

これまで、細胞レベルから個体レベルまで様々な代謝調節系に関わるタンパク質とされ
る AMPK の冬眠代謝調節系における関わりを明らかにするため、1 章では、中枢組織にお
990 ける AMPK 活性の変化が、シマリスの冬眠の代謝調節において重要である可能性について
示し、2 章では、冬眠に係る年周調節が認められないハプロタイプである非冬眠シマリスを
用いることで、活動期と比較した際に起こる冬眠期の脳内における AMPK の活性化が、シ
マリスの概年的な冬眠調節系のもとで起きる可能性を示した。しかし、これまでの研究では、
それらの変化が、低体温などの活動期と冬眠期の間で異なる体内環境の変化によって引き
995 起こされる可能性を排除することができていない。AMPK が季節的な冬眠調節系の下で活
性化することを明らかにするために、冬眠期の AMPK 活性化が、低体温に依存せず、
季節的な冬眠調節メカニズムにより起こる変化であるのかを検証する必要がある。

本章では、はじめに、シマリスの季節的な冬眠調節に関わるとされる HP の血中濃度とシマリスの体温周期を採材タイミングの指標とし、低体温になる直前の冬眠移行期における
1000 体組織のサンプリングを行い、動期、冬眠移行期、および冬眠期間における、AMPK および
下流のシグナル系因子のリン酸化量を比較した。次に、冬眠期のシマリス脳内に AMPK 阻
害剤を投与し、冬眠を阻害できるか否かを検証することで、AMPK の活性化が冬眠期の代
謝調節に関与し、冬眠の低体温誘導に関わっているかを明らかにした。

1005 方法

供試動物と飼育条件

本研究では、供試動物としてシベリアシマリス *Tamias sibiricus* が用いられた。実験に使用
されたシマリスは、(株) アークランドサカモトから購入された。すべての供試動物は、実
験に用いるまでの間、プラスチックケージ (縦 40 : 横 25 : 高さ 20 cm) で個別に分けられ、
1010 23°C および 12L:12D (Light:Dark) の明暗条件下で、標準マウス飼料 (MF、オリエンタル酵
母工業株式会社) および水が自由に摂取できる状態で飼育し、実験室環境に順化させた。ま
た、シマリスの採餌量を測定するため、毎日の給餌の際に、1 日のうち消費された餌の量を
測定し、記録した。順化された個体は、冬眠多型のスクリーニング (3 章を参照) を行い、
冬眠タイプのシマリスを選別した後に、野外の日長条件を模した実験室に移動させた。自然
1015 日長条件下の実験室の温度は、後述する 2 つの実験に合わせて、2 条件の設定を行った。1
つ目の温度設定は、シマリスの冬眠周期の推移に沿って組織の採材が行えるように、野外条
件と同様の温度になるように調節した。2 つ目は、冬眠阻害実験において用いる浸透圧ポン
プが低温条件下では正常に機能しないことを考慮し、気温を 1 年間 23°C に調整した条件を
設定した。

1020 すべての動物実験は、動物実験倫理委員会により審査され、新潟大学学長により承認され
た動物実験計画に沿って実施した(承認番号「NiigataUniv.SA00738, SA00776」)。実験のプロ

トコルは「Guiding Principles for Care and Use of Laboratory Animals」(米国 NIH) に準拠して行われた。

1025 シマリスの体温測定と冬眠状態の評価

シマリスの冬眠状態を確認するために、①赤外線照射温度計による表面体温の測定と、②温度ロガーの埋め込みによる深部体温の測定の2つの方法で体温の測定を行った。①はリスの体温を非侵襲的にモニタリングし、現在のシマリスの状態が活動期か冬眠期をモニタリングするために用い、②は、正確な深部体温データを取得し、供試個体における冬眠開

1030 始日および冬眠期間などを決定するために行った。表面体温の測定には、赤外線照射温度計 (HORIBA.Ltd) を用い、1日1回 16:00~21:00 の間に表面体温を測定した。本研究では、これまでの結果により、表面体温が 10°C以下を示した個体を冬眠状態であると判断し、実験に用いた(鎌田 博士論文 2020)。使用した温度ロガーには、iButton (サーモクロン G タイプおよび SL タイプ, KN ラボラトリーズ 株式会社) を用いた。温度ロガーに防水コーティングを行い、腹腔内に1年以上埋め込んだ後、実験終了後に腹腔内から取り出すことで、深部体温のデータを取得した。

組織の採材およびタンパク質の定量

自然日長条件下における採材は、シマリスの活動期である夏期、冬眠準備期である秋期、冬眠期である冬期の3つの時期を設定した。それぞれの時期の設定には、深部体温および月ごとの血中 HP 濃度を指標にし、HP 濃度が高く、体温が高い状態を「活動期」(図 4-1a)、冬眠期に先立ち HP 濃度が減少し始め、体温の低下が生じていない状態を「冬眠移行期」(図 4-1b)、低体温状態を「冬眠期」とした(図 4-1c)。血中 HP 濃度は、月に1度、大腿静脈から採取し、ウエスタンブロット法を用いることで測定された。採材に用いた個体は各時期5個体

1045 で、採材時には二酸化炭素を用いて麻酔状態になった後に、断頭により安楽死を行なった。

脳組織については、開頭後、脳を取り出し、氷上で大脳皮質、海馬、小脳、間脳、および視床下部の各部位に分けられた。末梢組織は、開腹した後、心臓、肝臓、腎臓、および骨格筋が採材された。各組織は、ドライアイスで凍結した後、実験に用いるまでに -80°C で保存された。

- 1050 凍結保存された各組織は、氷上で組織重量の 10 倍量の Lysis Buffer (2%SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH6.8))、蛋白分解酵素阻害剤 (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche Applied Science Ltd.)、脱リン酸化酵素阻害剤 (PhosSTOP; Roche Applied Science Ltd.) を用いてホモジェナイズされた。ホモジェナイズした溶液を遠心分離し(15,000rpm×60min)、上清を以降の実験に用いた。試料の一部は Micro BCA Reagent Kit(PIERCE Ltd.)を用いて、MICRO PLATE
- 1055 READER (BIO-RAD Ltd.) でタンパク質量を定量した。その後、試料は Sample Buffer(2M Tris-HCl(pH6.8)、10%SDS、グリセロール、Bromophenol Blue、2-mercaptoethanol)と混合し、解析に用いるまで -30°C で凍結保存された。

タンパク質発現量の評価

- 1060 活動期、冬眠移行期、および冬眠期のそれぞれの時期にサンプリングされた各組織におけるタンパク質の発現量は、ウエスタンブロット法によって検出された。タンパク量が 1 ウェル当たり 30 μg または 50 μg になるよう調整した後、10%または 7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE) をし、泳動後、ゲルを PVDF メンブレンに転写した。検出したい
- 1065 分子量に合わせてメンブレンをトリミングし、10%BSA (ALBUMIN BOVINE (SIGMA)/ TNT (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.05%Tween-20)) を用いてブロッキングした後、一次抗体として、AMPK に対しては AMPK Antibody (CST ジャパン) を、P-AMPK に対しては Phospho-AMPK α (40H9) Rabbit mAb (CST ジャパン) を、ACC に対しては ACC Antibody (CST ジャパン) を、P-ACC に対しては Phospho-ACC antibody を (CST ジャパン)、eEF2 と P-eEF2 に対しては Inamura et al. (2005) で作成された抗体を、いずれも 1:1000 (抗体:TNT) の濃度

1070 に調整し、オーバーナイトで反応させた。また、ローディングコントロールとして β -Actin
の検出するために、一次抗体として Mouse Anti Actin Monoclonal Antibody (Chemicon Co.) を
用いた。一次抗体を TNT で洗浄した後、二次抗体として、ウサギ由来の抗体に対しては
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (DakoCytomation) を、またマウス由来の抗
体に対しては Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno
1075 Research Inc.) を用い、いずれも 1:10000 (抗体:TNT) の濃度で希釈し、1 時間室温で反応
させた。二次抗体の洗浄後、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) を用いて化学発光さ
せ、X線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM) に感光させた。タンパク質の発現量は、
検出されたバンドをスキャナーで取り込み、“ImageJ”ソフトウェアを用いてバンドの濃さを
数値化した。算出された値は、いずれも活動期のタンパク質発現量の平均値を 100%として
1080 相対値で表した。

血糖値の測定

血糖値の測定は、血糖値自己測定機 (Freestyle Freedom, NIPRO) を用いて行われた。凍結
保存されていた血液を氷上で融解させた後、0.3 μ l 程の血液が測定に用いられた。

1085

AMPK 阻害剤の投与と影響評価

供試個体は、投与時期によって阻害剤の影響が異なることを考慮し、AMPK 阻害剤を投
与するシマリスを冬眠初期処理群として 5 頭、冬眠後期処理群として 5 個体、対照群とし
て 5 頭を設定した。なお、投与するまでに、個体の死亡や、冬眠における急激な体重の低下
1090 から実験処理に耐えることができないと判断した個体が頻出したことから、それぞれの処
理群につき 1 個体ずつ投与実験に用いた。AMPK 阻害剤としてドルソモルフィン二塩酸塩
(別名 Compound C) (Abcam) を人工脳脊髄液 (ACSF) (TOCRIS bioscience) で希釈した
溶液を、対照群には人工脳脊髄液 (ACSF) を用いた。実験に用いたシマリスは、3 種混合麻

酔（塩酸メドミジン、塩酸アチパメゾール(日本全薬株式会社)、ミダゾラム（アステラス製薬株式会社）を用いて麻酔した後、定位固定装置に入れ、骨膜を露出させるために頭皮に正中線切開を行った。シマリスの骨膜にドリルを用いて穴を開けた後に、22 ゲージのステンレス製留置針（Terumo）を挿入し、側脳室に浸透圧ポンプのカニューレがアクセスできるようにした。留置針を、脳脊髄液の滲出が確認できる位置に設置後、脳脊髄液が滲出する位置、深さにカニューレの先端を挿入した。カニューレを骨膜に、生体用接着剤およびエポキシ系接着剤で固定した後に、カニューレ部を歯科用セメントで覆った。その後、カニューレを、ACSF およびドルソモルフィンで満たした浸透圧ポンプ(Alzet)に接続した。カニューレと接続した浸透圧ポンプは、シマリスの背中中の皮下に埋め込んだ後に縫合した。ポンプは通常の温度において 0.25 μ l/h の流出速度で機能するため、既往の研究でげっ歯類に使用した容量に基づき（Florant et al. 2010）、0.5 μ g/day の速度でドルソモルフィンが投与されるように、溶液の濃度を調整した。浸透圧ポンプは低温下では機能が低下することから、正常に機能させるために実験室内の温度は $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持し、4 週間ごとにポンプを交換する手術を行った。このとき、 23°C 近傍に室温を維持した際にも、シマリスは室温と同程度まで体温が低下し、冬眠状態になることを確認した上で実験は遂行された。また、投与中は、供試個体の冬眠状態の有無を確認するため、1 日 1 回 15:00~19:00 の間に赤外線照射温度計を用いて表面体温を測定し、体温が 25°C 以下を示した個体を冬眠状態にあるとした。

統計解析

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で表された。活動期、冬眠準備期、および冬眠期における各タンパク質の発現量を比較するための統計解析には、R i386 3.6.1 を用いた。それぞれのデータセットの正規性の検定には、Shapiro-wilk の正規性の検定を用いた。正規分布と認められたデータセットでは Pairwise t-test を多重比較の方法として用い、正規分布として認められなかったデータセットでは Pairwise wilcox-test を多重比較の方法として用いた。そ

それぞれの検定において 5%未満を有意水準としてみなした。

1120 結果

活動期から冬眠期にかけての AMPK シグナル系タンパク質発現量の季節変化

AMPK の活性が低体温に依存せずに季節的に変化するか否かを調べるため、活動期、冬眠移行期、および冬眠期の各時期において、AMPK とそのシグナル系の下流標的である ACC と eEF2 のリン酸化タンパク質量(P-AMPK,P-ACC P-eEF2)、および総タンパク質発現量(total-AMPK, total-ACC, total-eEF2)を、大脳皮質、海馬、小脳、間脳、および視床下部において、それぞれ定量化した。

P-AMPK の発現量は、採材したすべての脳組織（大脳皮質、海馬、小脳、間脳、視床下部）において、活動期と比較し、冬眠期に有意に増加していた（大脳皮質:pair-wise t-test, $p=0.0017$, 海馬:pair-wise t-test, $p<0.001$, 小脳:pair-wise t-test, $p=0.007$, 間脳:pair-wise t-test, $p<0.001$, 視床下部:pair-wise t-test, $p=0.02$ ）（図 4-2）。また、P-AMPK の増加に伴い、P-ACC の発現量も海馬を除くすべての組織で増加し（大脳皮質:pair-wise t-test, $p=0.012$, 海馬:pair-wise t-test, $p<0.001$, 小脳:pair-wise t-test, $p=0.047$, 間脳:pair-wise t-test, $p=0.007$, 視床下部:pair-wise t-test, $p=0.004$ ）（図 4-3）、P-eEF2 の発現量も、間脳、および視床下部において、有意に増加しており（間脳:pair-wise t-test, $p<0.001$, 視床下部:pair-wise t-test, $p<0.001$ ）（図 4-4）、海馬においては、活動期と冬眠期の間で P-eEF2 の有意な増加は見られなかったものの、活動期との間に有意な差が見られなかった冬眠移行期と冬眠期の間では有意に増加していた（海馬-P-eEF2: 冬眠移行期-冬眠期, $p = 0.048$ ）。大脳皮質の P-eEF2 発現量について、有意差は認められなかったものの、冬眠期の発現量が、活動期に対して増加していた（図 4-4）。小脳の PeEF2 発現量については、いずれの時期の間においても有意差は認められなかった（図 4-3）。

1140 冬眠移行期に着目すると、間脳および視床下部において明瞭な応答が認められた。間脳では、活動期と比較して冬眠移行期に P-AMPK および P-eEF2 の発現量が有意に増加してお

り、さらに冬眠移行期と冬眠期にかけてもリン酸化量が有意に増加していた (P-AMPK:活動期-冬眠移行期, pair-wise t-test, $p=0.0055$, 冬眠移行期-冬眠期, pair-wise t-test, $p<0.001$, P-eEF2:活動期-冬眠移行期, pair-wise t-test, $p=0.01$, 冬眠移行期-冬眠期, pair-wise t-test, $p<0.001$) (図 4-2, 図 4-4)。視床下部においては、活動期と冬眠移行期、冬眠移行期および冬眠期それぞれの間には有意差はないものの、活動期と比較して冬眠移行期に P-AMPK のリン酸化量が増加する傾向が見られた(図 4-2)。P-ACC についても冬眠移行期にリン酸化量が増加する傾向が見られた (図 4-3)。

1150 シマリスの栄養条件の季節的变化

AMPK は低血糖や低酸素など細胞内のエネルギー不足を感知し活性化することが明らかとなっていることから、栄養状態が AMPK 活性の変化の原因となっているかどうかの指標になり得る。そのため、活動期、冬眠移行期、および冬眠期の各時期におけるシマリスの血糖値を測定し、それぞれのサンプリング時期におけるエネルギー状態を評価した(図 4-5)。

1155 活動期と冬眠移行期における血糖値の間には有意な差が見られなかったが、冬眠移行期と冬眠期における血糖値を比較すると、血糖値は冬眠期に減少する傾向が見られた(Pairwise wilcox-test, $p=0.08$)(図 4-5a)。また、活動期から冬眠移行期にかけての餌の消費量と体重を評価したところ、変化がほとんど見られなかった(図 4-5b)。

1160 シマリス脳内における AMPK 活性の阻害による冬眠への影響

冬眠期のシマリスにおいて、AMPK 阻害剤を脳内投与し、AMPK 活性を阻害することにより、冬眠期の体温パターンが変化するのかを調べた。対照群である個体に人工脳脊髄液を投与開始日から数回の低体温状態を示したことから、カニューレション実験そのものにより冬眠が阻害されないことが示された (図 4-6a)。AMPK 阻害剤としてドルソモルフィンを投与した処理群において、冬眠初期に投与を行った個体では、投与後に低体温状態を示すこと

はなかった（図 4-6b）。一方、冬眠後期に投与実験を行った個体では、投与開始からも数回の低体温状態を示した（図 4-6c）。

考察

1170 本研究では、概年的な冬眠調節の分子指標として HP を用い、活動期、冬眠移行期、および冬眠期にかけての AMPK シグナル系のリン酸化量の季節的变化を明らかにした。結果として、間脳および視床下部における、冬眠移行期特異的な AMPK シグナル系のタンパク質の活性化が認められた。冬眠移行期は低体温を伴わないフェーズであることから、本活性化は、低体温に依存しない生理的調節のもとで行われていると考えられた。さらに、各季節におけるシマリスの血糖値の測定結果と、活動期から冬眠移行期のサンプリングまでの摂食量の推移の結果から、冬眠移行期のエネルギー状態は活動期と同水準であることが明らかとなった。冬眠移行期における間脳および視床下部における AMPK の活性化は、エネルギー状態の悪化によって引き起こされたものではなく、エネルギー状態に依存しない季節的な調節系によって引き起こされたものであると考えられ、その背景には内因的な年周リズムが係わっている可能性が高い。一方で、冬眠期に脳全体で起きていた AMPK の活性化には、季節的な調節に加え、低体温や低血糖といった生理状態の変化も関与している可能性がある。内因的な年周リズムに従った冬眠移行期における間脳および視床下部での AMPK のリン酸化と、冬眠期における低体温・低血糖などに伴った脳全体での AMPK のリン酸化の段階的な AMPK の活性化が、シマリスの季節的な冬眠調節において起きていることが示唆

1175

1180

1185

冬眠移行期から AMPK が間脳や視床下部で活性化する意義としては、AMPK が関わる様々な代謝調節の機能を介して冬眠に必要な準備を行っていることが挙げられる。視床下部における AMPK は活性化することで、神経ペプチド Y (NPY) やアグーチ関連ペプチド (AgRP) の分泌を行い摂食の調節を行うことや、交感神経の活性化を介して、心臓や、肝臓、

1190 脂肪組織、褐色脂肪組織などの末梢組織において産熱の抑制や脂肪の分解、ベージュ組織の
産生など、様々な代謝機能をコントロールすることが報告されている(López et al.2016)。冬
眠動物の冬眠移行期に着目した研究は多くはないものの、多くの冬眠動物では古くからこ
の時期に摂食量が増加し体重の増加が促進されることが報告されていることや、冬眠前か
ら基礎体温が低下すること(Sheriff et al. 2012)、白色脂肪組織がベージュ細胞に切り替わるこ
1195 と(Chayama et al. 2019)などが知られてきている。また、近年の分子的な実験手法の発達から、
冬眠移行期には心臓や褐色脂肪組織において、脂肪酸結合タンパク質(FABP3)の発現が上昇
することがわかってきており、脂肪酸代謝に関わるメカニズムは冬眠前から変化すること
が示唆されている(Hindle and Martin 2014, Grabek et al. 2011)。以上から、冬眠移行期におい
て変化するような因子や特徴は、中枢の AMPK 活性が関与する代謝機能と共通なものが多
1200 く、冬眠移行期において活性化する間脳や視床下部の AMPK が、これらの変化を調節する
ことで冬眠の準備を行っている可能性が考えられる。

冬眠移行期において AMPK 活性を調節している要因に関しては、冬眠の年周リズムに基
づく内的因子の一つで、本研究で冬眠周期の指標として用いた HP が有力な候補の一つとし
て挙げられる。HP は、冬眠の年周リズムを制御するタンパク質として知られ、冬眠期に先
1205 立って血中から脳内へ移行することで冬眠を誘導することが明らかとなっている(Kondo et
al. 2006)。HP は AMPK を活性化させるホルモンであるアディポネクチンと高い相同性を持
つことが知られている(Tang et al. 2005)。一般的に構造の類似しているファミリータンパク
質は同様の機能を持つことから、HP は冬眠における AMPK の活性調節に関与している可
能性が考えられる。また、現在までに、シマリスで発見された HP の機能の多くは明らか
1210 になっていないものの、牛で発見された HP ホモログの研究から、HP の機能の一つとして、
脳内における摂食調節に関わる可能性が指摘されている (Seldin et al. 2014)。AMPK が、間
脳や視床下部において、摂食調節の重要な因子の一つであることから、HP が摂食調節系
に作用することで AMPK の活性の調節に関与する可能性が考えられる。今後は、AMPK と

冬眠の関係性をより理解するために、HP などの冬眠調節に関わる因子との関連性を調べていく必要がある。

本章では、冬眠に併せて脳内で起きる AMPK の活性化と冬眠調節との関わりを検証するため、脳内に AMPK 阻害剤のドルソモルフィンを投与することにより、AMPK 活性を抑制し、冬眠期の体温変動の変化を観察した。結果として、冬眠初期にドルソモルフィンを投与した個体では、投与後に低体温の継続が示されず、冬眠を阻害できた。一方で、冬眠後期に投与を行った個体では、投与後も引き続き低体温状態が断続的にみられ、冬眠を阻害することができなかった。阻害剤の投与タイミングの違いで体温変化の差が確認された理由としては、冬眠期の時期によって薬効の感度に差があることが挙げられる。シマリスにおける既往の研究では、HP 抗体の脳内投与による HP 阻害実験において、HP 抗体が投与される冬眠の時期によって、冬眠阻害の程度に違いがあることが示されている。この研究では、冬眠初期と冬眠後期よりも、冬眠中期において抗体による冬眠抑制の効果が最も薄いことが報告されており、これは脳内における HP の濃度が冬眠中期で最も高いことから、HP 交替により冬眠を完全に抑制することができなかったからと考えられている(Kondo et al. 2006)。このことから、AMPK 活性の抑制による冬眠阻害の程度にも、冬眠時期による違いの影響を受けていることが考えられる。一方で、今回の実験では、ラットやマウス等の実験動物に対する薬剤投与濃度を参照したため、供試個体のシマリスにおいては AMPK のリン酸化を抑制する適切な薬剤濃度の設定ができていなかった可能性がある。さらに、今回の実験では、脳内においてドルソモルフィンが実際に標的となる組織に作用しているかどうかの評価ができていないため、投与後に見られた応答がドルソモルフィンによる影響なのか否かの判断ができない。そのため、今後は、AMPK と冬眠調節との関わりを検証していくために、供試個体数や投与時期、投与濃度、投与部位の検討などを十分に吟味する必要がある。しかし、1 個体であってもドルソモルフィン投与個体において低体温状態を阻害できた結果が得られたことは、冬眠調節において AMPK が重要であることを示唆する大きな足がかりとなる

と考えられる。

1240 以上から、本章では、冬眠前のシマリス脳内で起こる AMPK シグナル系の変化が、低体
温に依存しておらず、概年的な冬眠調節により調節された結果であることが明らかとなり、
脳内の AMPK 阻害実験により、冬眠の低体温誘導に AMPK が直接関わっている可能性が示
唆された。一方で、脳内で活性化した AMPK がどのようなメカニズムで全身の体温や代謝
調節にかかわっているのかは明らかにできていないため、今後は冬眠における AMPK の生
理的機能や役割、HP との関連性など更なる研究が必要となる。

1245

1250

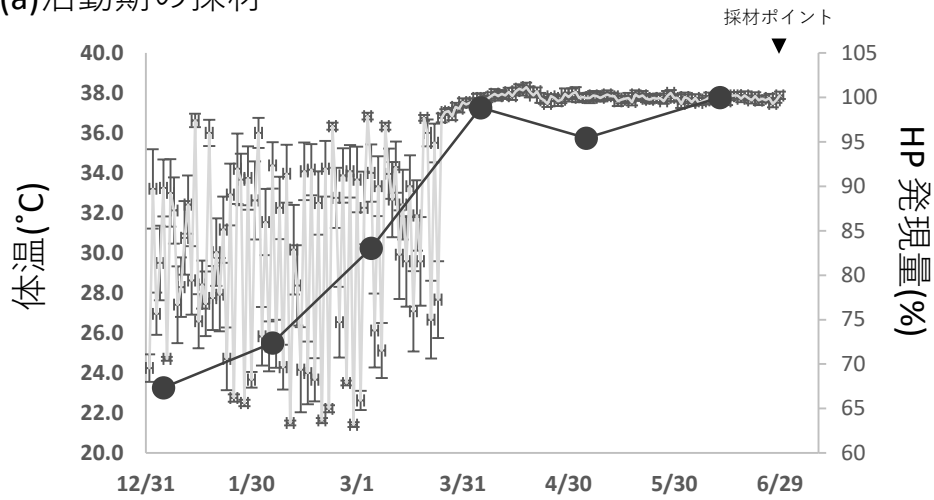
1255

1260

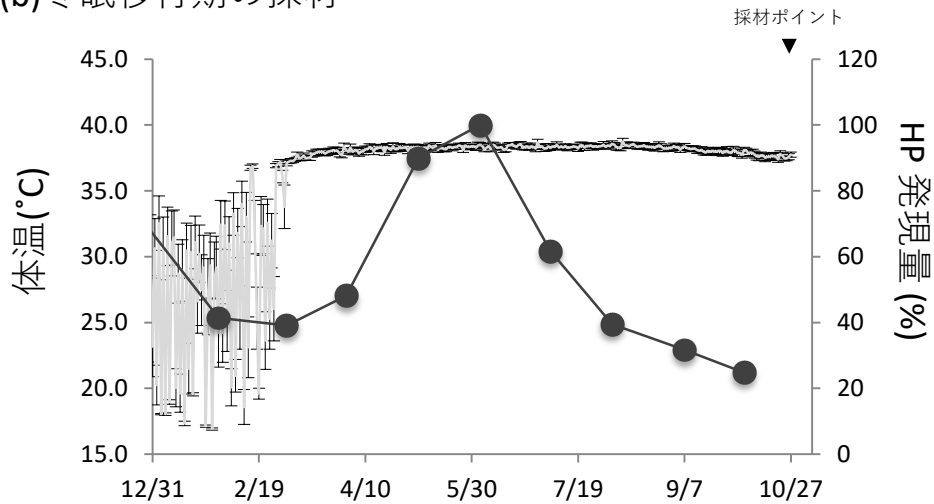
1265

1270

(a)活動期の採材



(b)冬眠移行期の採材



(c)冬眠期の採材

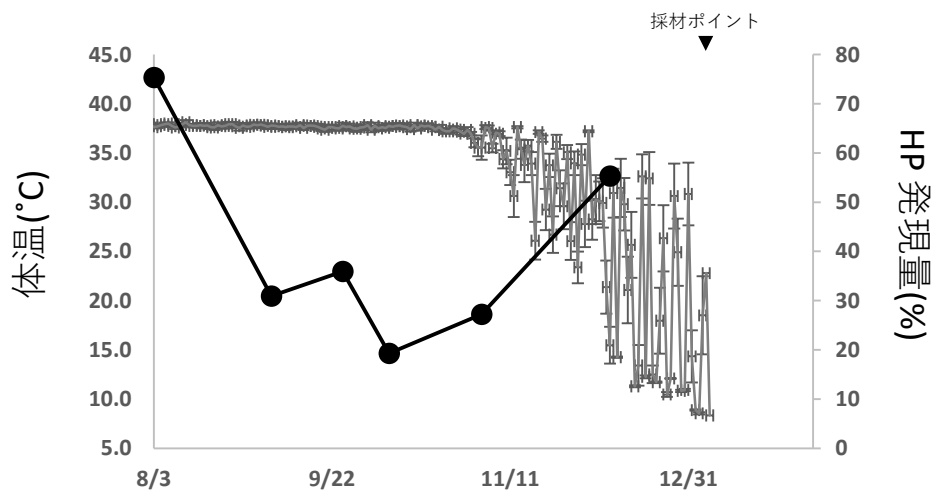
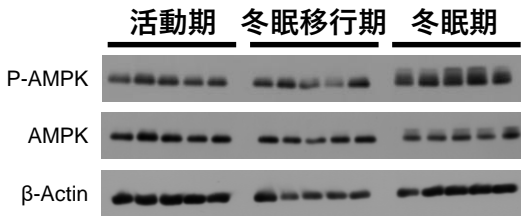


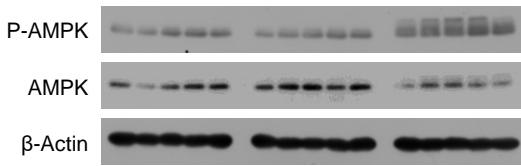
図4-1. 各採材タイミングにおける体温推移と血中HP20の変動。

それぞれのサンプリング条件におけるシマリスの体温およびHPの季節推移を示した。灰色の線は、それぞれのシマリスの深部体温を表しており、深部体温はibuttonにより記録され、サンプリング時に取り出された(値は一日に12回記録された体温の平均値±S.E)。黒線はHPの血中濃度の推移を示しており、ウェスタンブロッティングを用いて測定されたHP濃度が一番高い値を100%とし、相対的な濃度を測定した。▼は採材を行った日にちを示している。(a)は活動期にサンプリングされた個体を、(b)は冬眠移行期に、(c)は冬眠にサンプリングされた個体の例を示している。

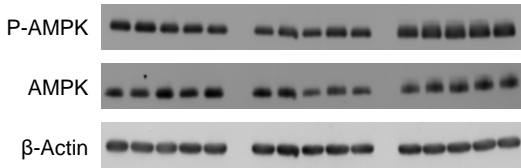
(a) 大脳皮質



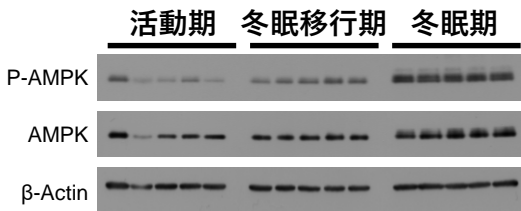
(b) 海馬



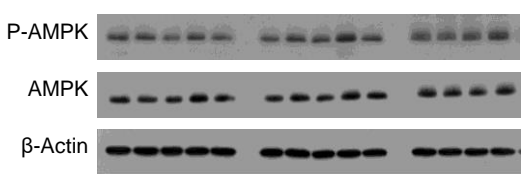
(c) 小脳



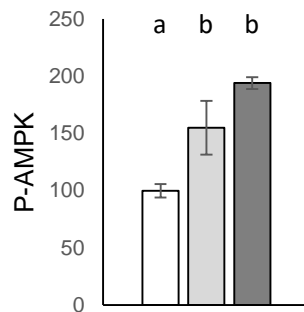
(j) 間脳



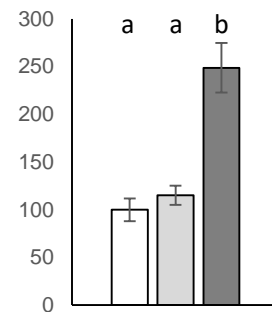
(k) 視床下部



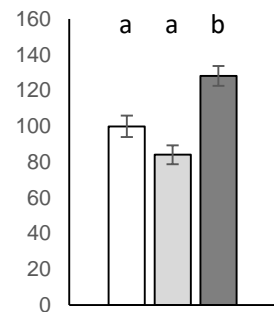
(d) 大脳皮質



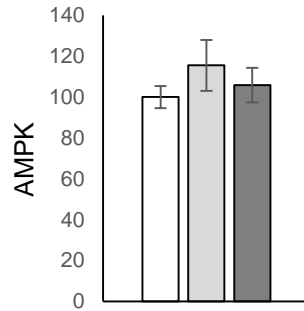
(f) 海馬



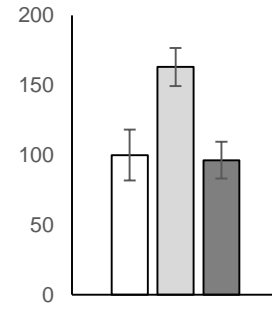
(h) 小脳



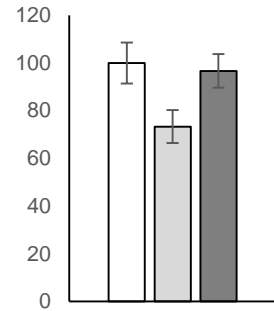
(e) 大脳皮質



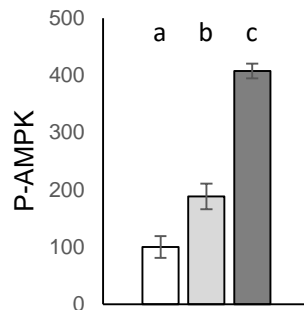
(g) 海馬



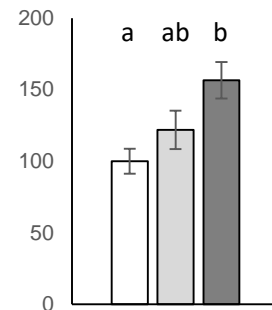
(i) 小脳



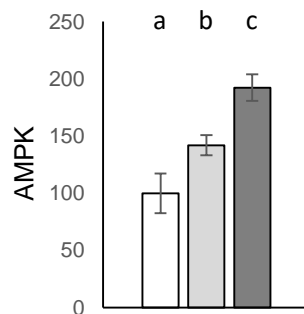
(l) 間脳



(n) 視床下部



(m) 間脳



(o) 視床下部

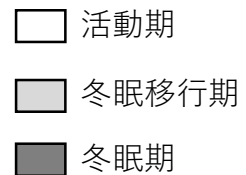
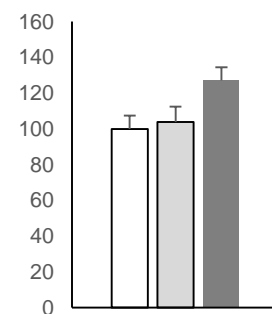
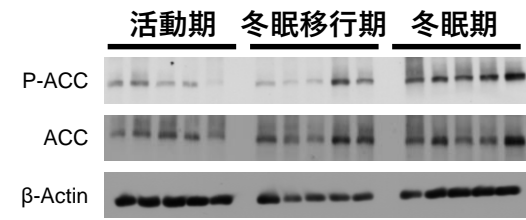


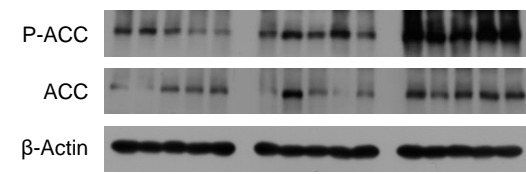
図4-2. シマリスの脳の各部位におけるAMPK発現量の季節間比較。

(a~k); ウェスタンブロッティングによる各組織のAMPKの発現量(a~c, j~k), P-AMPKを定量し比較したグラフ (d, f, h, l, n), AMPKを定量し比較したグラフ (e, g, I, m, o)。グラフのバーは平均±SEを表す (冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=5, (視床下部のみ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=4)。グラフ中のアルファベットの違いは、Holmの補正のもとで多重比較が行われ、 $p < 0.05$ 以下であったことを示している。

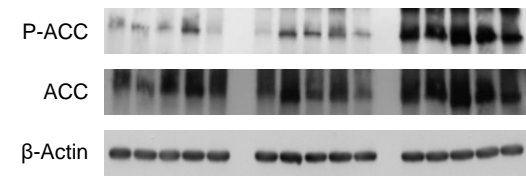
(a) 大脳皮質



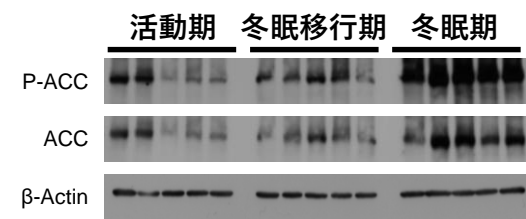
(b) 海馬



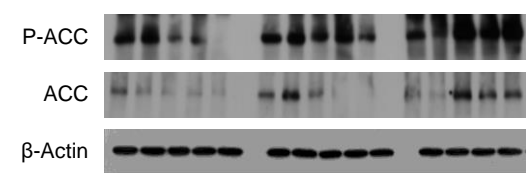
(c) 小脳



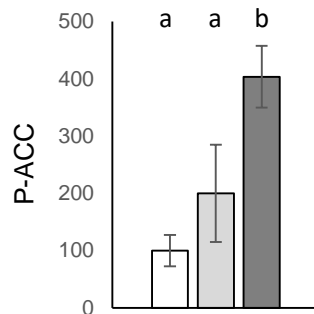
(j) 間脳



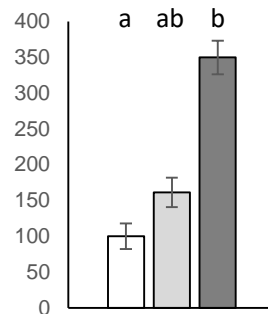
(k) 視床下部



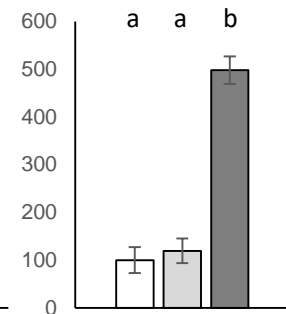
(d) 大脳皮質



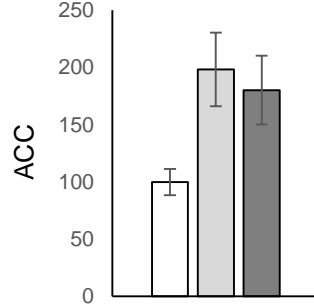
(f) 海馬



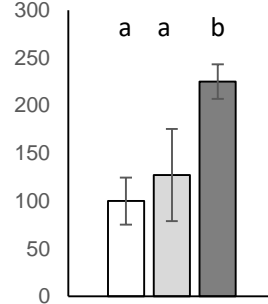
(h) 小脳



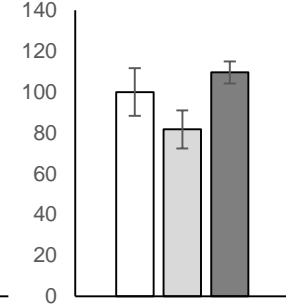
(e) 大脳皮質



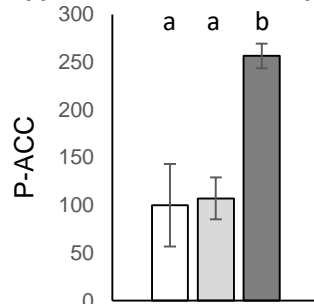
(g) 海馬



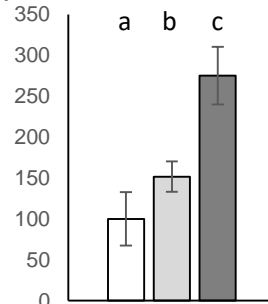
(i) 小脳



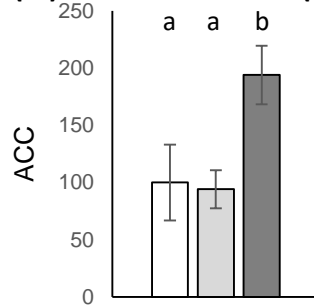
(l) 間脳



(n) 視床下部



(m) 間脳



(o) 視床下部

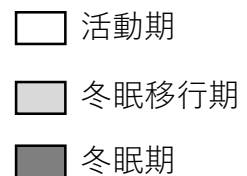
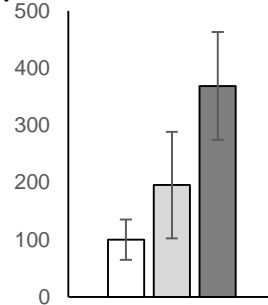
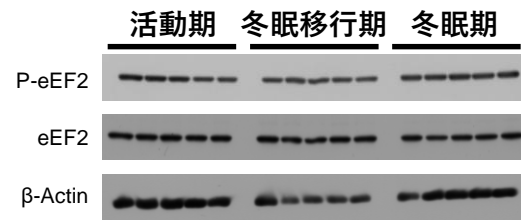


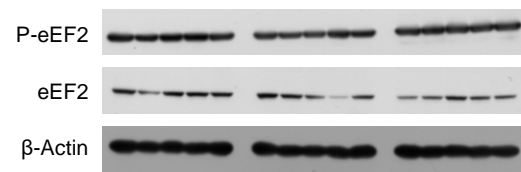
図4-3. シマリスの脳の各部位におけるACC発現量の季節間比較。

(j); ウェスタンブロッティングによる各組織のACCの発現量(a~c, j~k), P-AMPKを定量し比較したグラフ(d, f, h, l, n), ACCを定量し比較したグラフ(e, g, l, m, o)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=5, (視床下部のみ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=4)。グラフ中のアルファベットの違いは、Holmの補正のもとで多重比較が行われ、p<0.05以下であったことを示している。

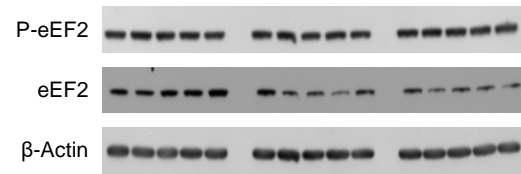
(a) 大脳皮質



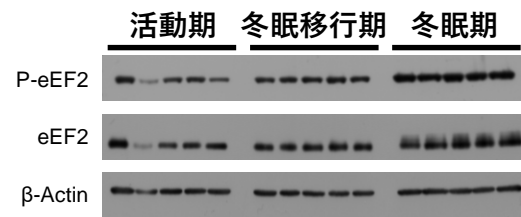
(b) 海馬



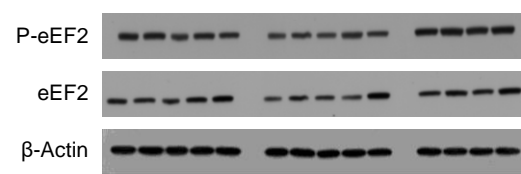
(c) 小脳



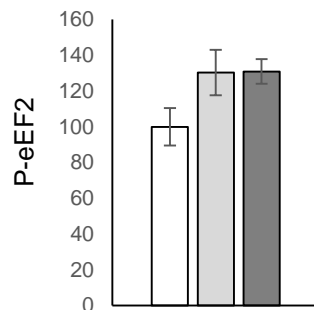
(j) 間脳



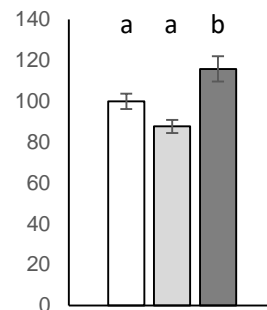
(k) 視床下部



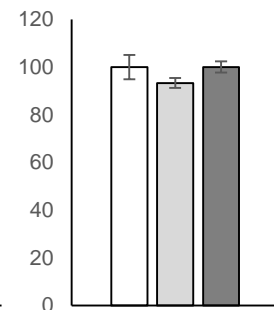
(d) 大脳皮質



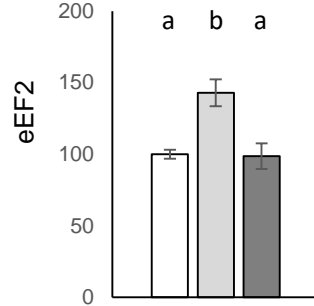
(f) 海馬



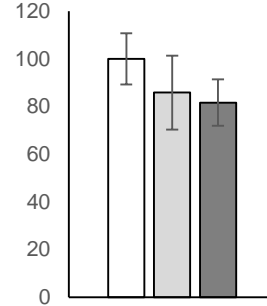
(h) 小脳



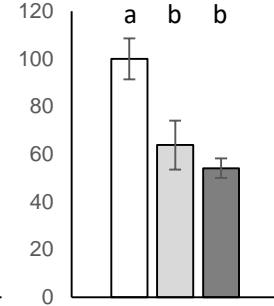
(e) 大脳皮質



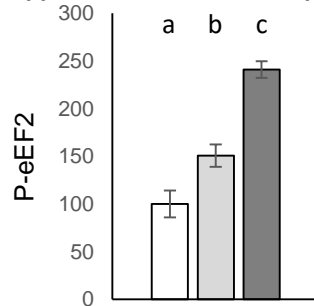
(g) 海馬



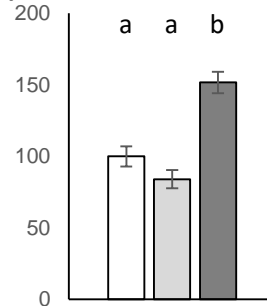
(i) 小脳



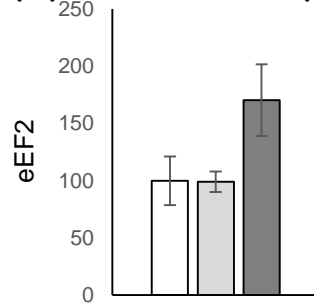
(l) 間脳



(n) 視床下部



(m) 間脳



(o) 視床下部

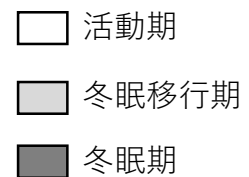
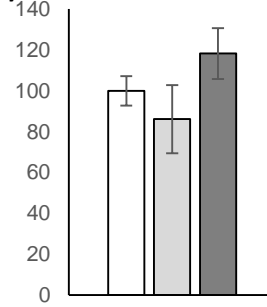
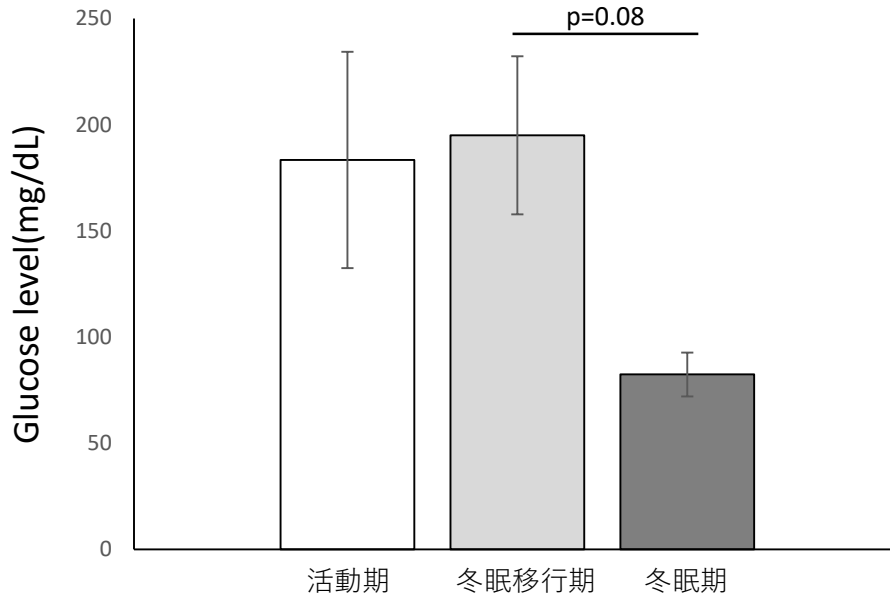


図4-4. シマリスの脳の各部位におけるeEF2発現量の季節間比較。

(a~k); ウェスタンブロッティングによる各組織のeEF2の発現量(a~k), P-eEF2を定量し比較したグラフ(d, f, h, l, n), eEF2を定量し比較したグラフ(e, g, i, m, o)。グラフのバーは平均±SEを表す(冬眠タイプ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=5, (視床下部のみ: 活動期n=5, 冬眠移行期n=5, 冬眠期n=4)。グラフ中のアルファベットの違いは、Holmの補正のもとで多重比較が行われ、 $p < 0.05$ 以下であったことを示している。

a



b

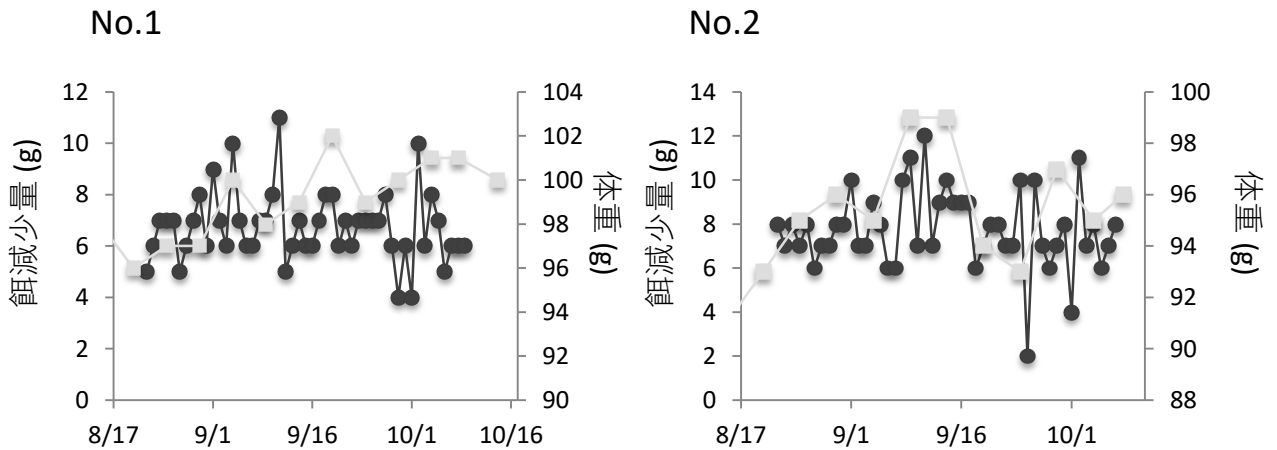
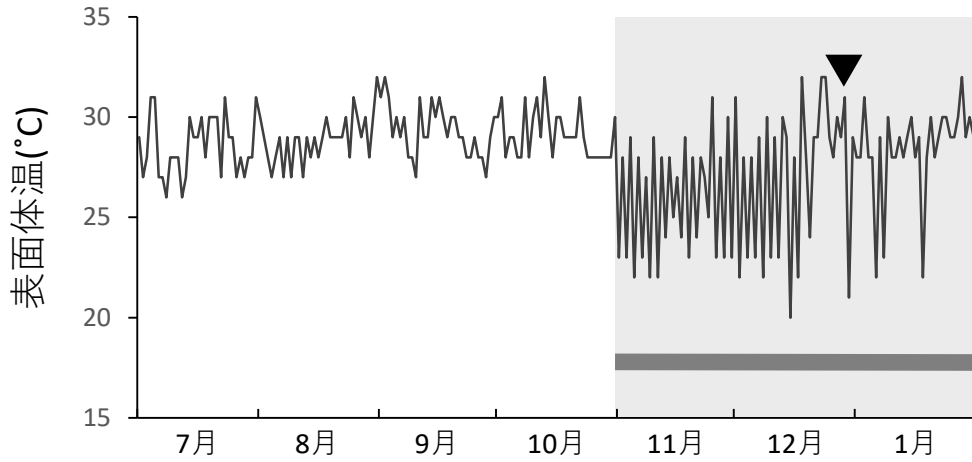


図4-5. シマリスのエネルギー状態の季節的な推移。

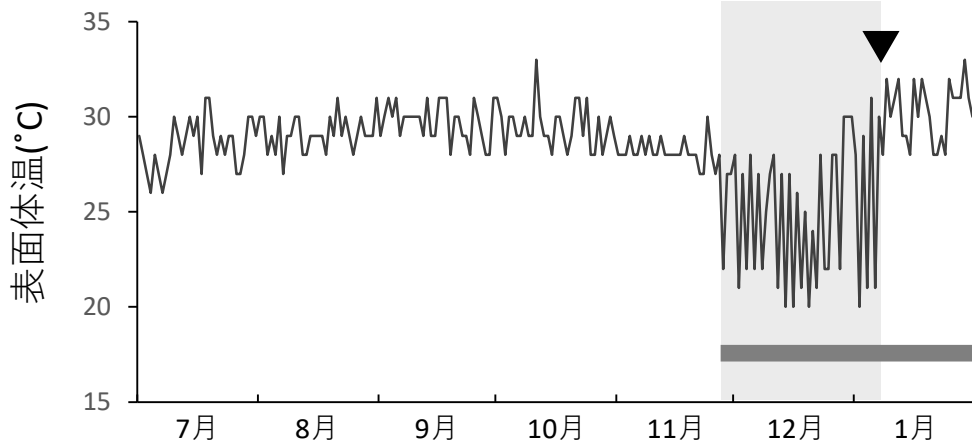
(a)血糖値は、活動期 (white bar, n=5,) と冬眠移行期(light grey bar, n=5)と冬眠期(deep grey bar, n=5)においてそれぞれ採取された血液を用いて測定された。グラフの値は平均値±SEで表される。p値は、Holmの補正のもとで多重比較が行われ、算出された。

(b)餌の減少量は毎日16:00に餌の量を測り、前日との差で表された。シマリスの体重は、3日に一度測定された。グラフは、冬眠移行期に採材された個体のうち、2個体のものを例として示した。(black line:餌減少量, grey line: 体重)

a



b



c

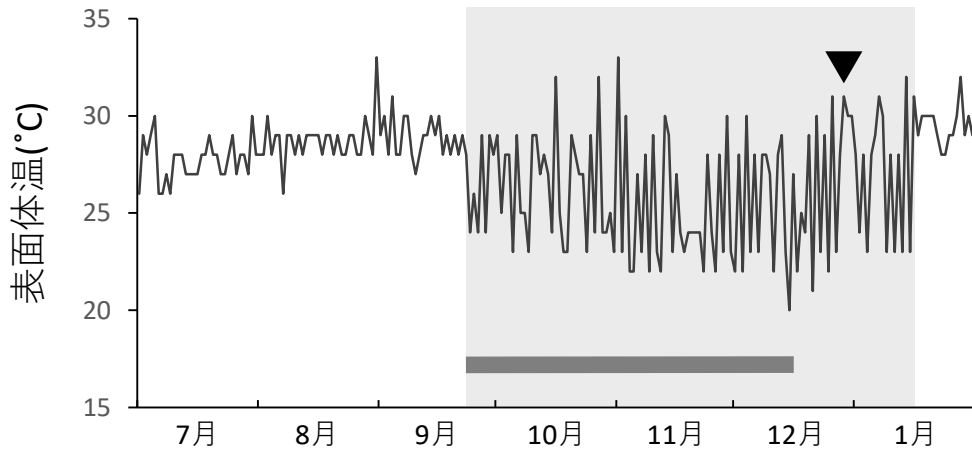


図4-6. 冬眠シマリスにおけるAMPK阻害剤を用いた冬眠の抑制.

ドルソモルフィンによる冬眠阻害実験に用いた3匹のシマリスの体温推移を表した。外気温は、浸透圧ポンプの機能維持のため23°C前後に保たれた。灰色の網掛けは、それぞれの個体の低体温出会った期間を、濃い灰色の線は、前年の冬眠期間を表している。▼はドルソモルフィンを投与した日にちを示している。(a)は実験のコントロールとして人工脳脊髄液を、(b)は冬眠の初期にドルソモルフィンの投与を、(c)は冬眠の後期にドルソモルフィンを投与した個体を示している。

5 章. 総合考察

本論文では、冬眠における著しい低体温、低代謝がどのように調節されているのかのメカニズムを解明する一環として、哺乳類の体で様々な代謝調節に関わる AMP-activated protein Kinase(AMPK)に着目し、シマリスの季節的な冬眠の調節のもとで AMPK の活性調節が行われるかどうかを明らかにすることを目的とした。本研究では、シマリスの季節的な冬眠を脳において調節のもとで、脳内の AMPK が冬眠において活性化され、全身の代謝調節を行うという仮説のもと、3つの知見を明らかにした。

1つ目として、冬眠に併せた AMPK の活性化が、抹消組織では認められず、脳内特異的に認められる現象であることを明らかにした。

2つ目として、シマリスの年周期的な冬眠調節に係る HP リズムに変異を有する非冬眠シマリスにおいて、季節的な AMPK 活性化が認められなかったことから、AMPK 活性化の背景には冬眠の年周的調節が関与している可能性が示された。

3つ目として、冬眠期に認められた脳内 AMPK の活性化のうち、視床下部と間脳における活性化が冬眠移行期においても認められ、低体温に依存しない応答であることを示したことである。また例数は少ないものの AMPK 阻害剤の脳内投与により、冬眠を抑制することができたことである。

以降では、得られた3つの知見から、シマリスの冬眠の季節的な調節系のもとで AMPK がどのような挙動を取り、冬眠にどのような機能を果たすかについて論考する(図 5-1)。活動期から冬眠移行期にかけて、間脳や視床下部において AMPK が活性化することが示されており、これは、冬眠の概年的なリズムの下で活性化されていると考えられる。この冬眠移行期での AMPK の活性化は、C1q ファミリーに属するアディポネクチンとの相同性から、冬眠の概年リズムによって血中から脳内へ移行した HP によって引き起こされていると考えられる。体の恒常性を支配する間脳や視床下部で活性化された AMPK は、冬眠のための熱産生の抑制や、エネルギー消費の抑制、脂肪代謝の調節に関与している可能性がある。これ

は、既往の研究から、中枢組織における AMPK の活性化が、神経系を介して、褐色脂肪組織や肝臓などの末梢組織における熱生産の抑制や、脂肪代謝の調節をすることが示されていることから考えられる。そのため、冬眠移行期における AMPK の活性化は、冬眠期の脂肪代謝調節や低代謝状態への移行プロセスに重要な役割を担っているのかもしれない。また、冬眠移行期から冬眠期になると、脳内の HP の濃度が上昇することが報告されており、間脳や視床下部の AMPK の活性化は増強されることが考えられる。それが AMPK による末梢組織への代謝抑制シグナルを増強させ、そのプロセスが冬眠の低体温を起こすことの一因となることが考えられる。低体温が発現する冬眠期には、間脳や視床下部以外の脳組織全体においても、AMPK の活性が亢進し、間脳や視床下部においても、さらに AMPK の活性が上昇する。この冬眠期における脳組織全体での AMPK の活性化は、神経組織に共通して起こる現象であると考えられる。これまでの冬眠の研究において、冬眠中の脳は低酸素、低血糖状態のいわゆる虚血状態であることが知られており、そのような状態下でも生命活動を正常に維持していることから、冬眠動物の脳では虚血耐性が強く発現していることが指摘されてきた。たとえば、虚血性障害の原因の一つとなる過剰なタンパク質合成が、冬眠動物の脳では抑制されていることなどが報告されている。AMPK は、細胞内においてタンパク質合成を抑制することで虚血から細胞を保護する機能があることが言われており、冬眠期に起こる脳全体的な AMPK の活性化は、神経組織を低温から保護する機能も持つのかもしれない。これらのことから、AMPK 阻害剤による冬眠の中断は、間脳や視床下部からの低代謝シグナルや、低体温下での神経細胞保護機能が抑制されたことにより引き起こされた可能性がある。

今後の課題として、本研究では検証不足であった AMPK の阻害剤の投与実験の拡充、投与前後における冬眠に関連した生理状態の変化の解明、HP と AMPK の関連性を明らかにし、AMPK が冬眠の年周期的な調節系の支配を受けているかどうかの検証が挙げられる。これらを行うことによって、冬眠の年周期的な調節から末端での生理機能において、AMPK シグ

1320 ナルカスケードを介した冬眠調節系の全貌が見えてくるだろう。

1325

1330

1335

1340

1345

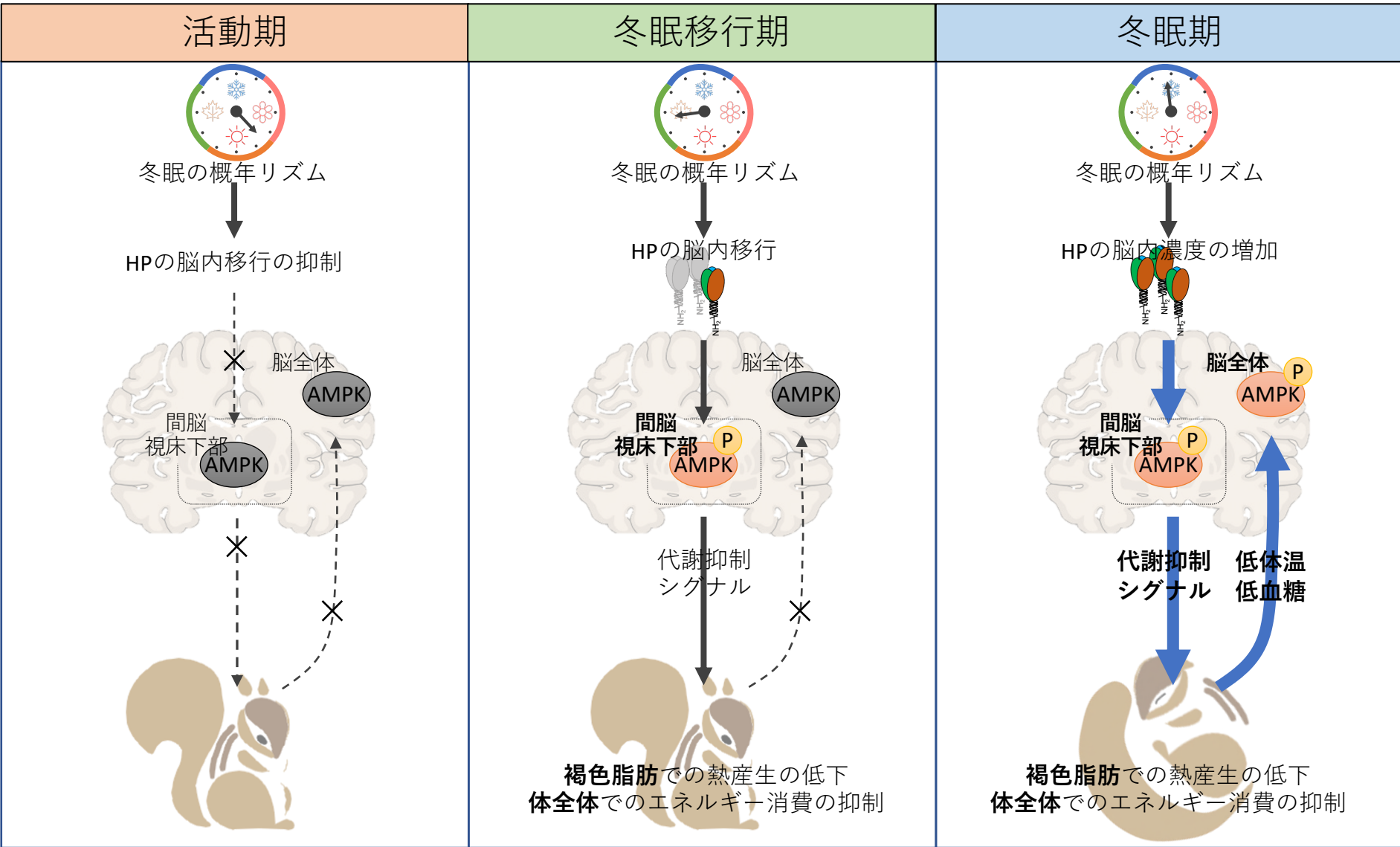


図5-1. シマリスの概年的な冬眠周期におけるAMPKの活性調節およびその機能
 本研究で明らかとなったシマリスの冬眠周期におけるAMPKの季節的な活性の変化を、シマリスの冬眠調節系との関連性を示しながら、その季節的な活性化モデルを図として示した。図中の矢印は、冬眠における様々なシグナルの流れを表している。破線はシグナル伝達が生じていないことを、実線はシグナル伝達が生じていることを示している。青で示した太い矢印は、実線で示されているシグナルの伝達が増強することを示している。

謝辞

1350 本研究の遂行にあたり、新潟大学農学部の間島恒夫教授には、主指導教官として、本論文をはじめ、さまざまな実験手法シマリスの管理の手法など終始ご指導いただきました。新潟大学農学部の箕口秀夫教授、理学部の伊藤孝祐准教授、また理学部を退職なされた内海利男博士には、副指導教官として本論文を作成する上で様々なご指導をいただきました。理学部の安東宏徳教授には副査として研究の助言をいただきました。また、このシマリスの研究を行

1355 うにあたっては、近藤宣明博士の長年の冬眠の研究の上に成り立っています。研究室の先輩方や後輩の方々には本研究の遂行にあたり、議論や実験の補助などを通して大変お世話になりました。また、両親を始めとして、家族と親戚の方々には博士課程への進学、在学を通して深い理解と多大なる支援をいただきました。そして、新潟大学脳研究所の武井延之准教授には、研究の着想から現在の成果が得られるまでに、長年にわたって、研究の指導や議論、

1360 実験のご指導を頂きました。以上の方々には、この場をお借りして、感謝の意を表すとともに、厚く御礼申し上げます。

1365

1370

引用文献

- 1375 Bailey, S. M., Udoh, U. S., Young, M. E. 2014. Circadian regulation of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 222(2), R75–R96.
- Buck, C.L., Barnes, B.M. 2000. Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an Arctic hibernator. *American Physiological Society* 279:255–262.
- 1380 Burkewitz, K., Zhang, Y., Mair, W. B. 2014. AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metabolism*. 20(1):10-25.
- Browne, G. J., Finn, S. G., Proud, C. G. 2004. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 12220–12231.
- 1385 Chayama, Y., Ando, L., Sato, Y., Shigenobu, S., Anegawa, D., Fujimoto, T., Taii, H., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y. 2019. Molecular basis of white adipose tissue remodeling that precedes and coincides with hibernation in the syrian hamster, a food-storing hibernator. *Frontiers in Physiology*. 9:1973.
- 1390 Chen, Y., Matsushita, M., Nairn, A.C., Cai, D., Frerich, K. U., Hallenbeck, J. M. 2001. Mechanisms for Increased Levels of Phosphorylation of Elongation Factor-2 during Hibernation in Ground Squirrels. *Biochemistry*, 40 (38), 11565–11570.
- 1395 Clarke, A., Pörtner, H.O. 2010. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biological Review* 85: 703–727.
- Corbett, J., Harwood, J. J. 2007. Inhibitors of Mammalian Acetyl-CoA Carboxylase. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 2(3), 162–180.
- 1400 Davies, S. P., Carling, D., Munday, M. R., Hardie, D. G. 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *European Journal of Biochemistry*. 203, 615–623.
- 1405 Epperson, L. E., Martin, S. L. 2002. Quantitative assessment of ground squirrel mRNA levels in

multiple stages of hibernation. *Physiological Genomics*, 10(2), 93-102.

1410 Frare, C., Jenkins, M. E., McClure, K.M., Drew, K. L., Seasonal decrease in thermogenesis and increase in vasoconstriction explain seasonal response to N6-cyclohexyladenosine-induced hibernation in the Arctic ground squirrel (*Uroditellus parryii*). 2019. *Journal of Neurochemistry*.151(3):316-335.

1415 Frerichs, K. U., Smith, C. B., Brenner, M., DeGracia, D. J., Krause, G. S., Marrone, L., ... Hallenbeck, J. M. 1998. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14511–14516.

1420 Florant, G. L., Fenn, A. M., Healy, J. E., Wilkerson, G. K., Handa, R. J. 2010. To eat or not to eat: the effect of AICAR on food intake regulation in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Journal of Experimental Biology*. 213(Pt 12):2031-7.

Geiser, F. 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annual Review of Physiology*, 66: 239–74.

1425 Geiser, F., Stawski, C., Wacker, CB. and Nowack, J. 2017. Phoenix from the Ashes: Fire, Torpor, and the Evolution of Mammalian Endothermy. *Frontiers of Physiology* 8: 842.

1430 Grabek, K. R., Karimpour-Fard, A., Epperson, L. E., Hindle, A. G., Hunter, L. E, Martin, S. L. 2011 Multistate proteomics analysis reveals novel strategies used by a hibernator to precondition the heart and conserve ATP for winter heterothermy. *Physiological Genomics*. 43: 1263–1275.

Grabek, K. R., Martin, S. L., Hindle, A. G. 2015. Proteomics approaches shed new light on hibernation physiology. *Journal of Comparative Physiology B*, 185(6): 607–627.

1435 Hardie, D. G. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway–new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*. 117: 5479–5487.

Hardie, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 774-785.

1440 Healy, J. E., Gearhart, C. N., Bateman, J. L., Handa, R. J., & Florant, G. L. 2011. AMPK and ACC change with fasting and physiological condition in euthermic and hibernating golden-mantled ground

- squirrels (*Callospermophilus lateralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 159(3), 322–331.
- 1445 Hindle, A. G., Martin, S. L. 2014 Intrinsic circannual regulation of brown adipose tissue form and function in tune with hibernation. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 306: E284–E299.
- Horman, S., Hussain, N., Dilworth, S. M., Storey, K. B., & Rider, M. H. 2005. Evaluation of the role
1450 of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in mammalian hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 142(4), 374–382.
- Inamura, N., Nawa, H., Takei, N. 2005. Enhancement of translation elongation in neurons by brain-derived neurotrophic factor: Implications for mammalian target of rapamycin signaling. *Journal of*
1455 *Neurochemistry*, 95, 1438–1445.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K. L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577–590 .
- 1460 Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., Oikawa, S. 2008. Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regulatory Peptides*, 151(1-3), 164–169.
- Jastroch, M., Giroud, S., Barrett, P., Geiser, F., Heldmaier, G., Herwig, A. 2016. Seasonal Control of
1465 Mammalian Energy Balance: Recent Advances in the Understanding of Daily Torpor and Hibernation. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(11).
- Johanns, M., Pyrdit Ruys, S., Houddane, A., Vertommen, D., Herinckx, G., Hue, L., Proud, C. G.,
Rider, M. H. 2017. Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-
1470 activated protein kinase. *Cellular Signaling*. 36 :212-221.
- 鎌田 泰斗. 2020, 博士論文 リス科における冬眠特異的タンパク質(HP)の進化に関する研究.
- 1475 川道武男・近藤宣昭・森田哲夫. 2000. 冬眠する哺乳類. 第2章 冬眠の生態学(川道武男, 編) pp.31-99. 東京大学出版, 東京.

- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D. G. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*. 1(1):15-25.
- 1480
- Kajita, K., Mune, T., Ikeda, T., Matsumoto, M., Uno, Y., Sugiyama, C., Matsubara, K., Morita, H., Takemura, M., Seishima, M., Takeda, J., Ishizuka, T. 2008. Effect of fasting on PPARgamma and AMPK activity in adipocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 81(2):144-9.
- 1485
- Kinnunen, S., Mänttari, S., Herzig, K. H., Nieminen, P., Mustonen, A. M., Saarela, S. 2016. Effects of wintertime fasting and seasonal adaptation on AMPK and ACC in hypothalamus, adipose tissue and liver of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 192: 44–51.
- 1490
- Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., Denderen, B., Jennings, I. G., Iseli, T., Michell, B. J., Witters, L. A. 2003. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society Transactions*. 31(Pt 1):162-8.
- 1495
- Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., Reid, K. B. M., Arlaud, G. J. 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility, 25(10).
- Knight, J. R., Bastide, A., Roobol, A., Roobol, J., Jackson, T. J., Utami, W., Barrett, D. A., Smales, C. M., Willis, A. E. 2015. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the cold stress response by slowing translation elongation. *Biochemical Journal*. 465(2):227-38.
- 1500
- Kondo, N. 1987. Identification of a pre-hibernating state in myocardium from nonhibernating chipmunks. *Experientia*, 43(8), 873-875.
- 1505
- Kondo, N., & Kondo, J. 1992. Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. *Journal of Biological Chemistry*, 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(1), 161–172.
- 1510
- Kondo, N., Shibata, S. 1984. Calcium source for excitation-contraction coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks. *Science*. 225(4662):641-3.

- 1515 Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Minokoshi, Y., Kadowaki, T. 2007. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metabolism*, 6(1), 55–68.
- 1520 Lee, W., Kim, M. J., Park, E.J., Choi, Y. J., Park, S. Y. 2010. C1qTNF-related protein-6 mediates fatty acid oxidation via the activation of the AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters*, 584(5), 968–972.
- 1525 Liu, H., Xu, Y., Hu, F. 2020. AMPK in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus: A Key Regulator for Thermogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 11:578830.
- López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Diéguez, C. 2016. Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(7): 421-32.
- 1530 Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A., & Okamoto, S. 2008. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition*, 24(9), 786–790.
- 1535 Mohr, U., Althoff, J., Spielhoff, R. Bresch, H. 1973. The influence of hibernation upon the carcinogenic effect of N-diethylnitrosamine in European hamsters. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*. 80: 285–288.
- 1540 Nairn, A. C., Palfrey, H. C. 1987. Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *Journal of Biological Chemistry*. 262: 17299–172303.
- Olson, J. M., Jinka, T. R., Larson, L. K., Danielson, J. J., Moore, J. T., Carpluck, J., Drew, K. L. 2013. Circannual rhythm in body temperature, torpor, and sensitivity to A₁ adenosine receptor agonist in arctic ground squirrels. *Journal of Biological Rhythms*. 28(3):201-7.
- 1545 Pérez, J. H., Furlow, J. D., Wingfield, J. C., Ramenofsky, M. 2016. Regulation of vernal migration in Gambel's white-crowned sparrows: Role of thyroxine and triiodothyronine. *Hormones and Behavior*, 84:50-56.
- Puspitasari, A., Cerri, M. Takahashi, A. Yoshida, Y., Hanamura, K., Tinganelli, W. 2021. Hibernation

- 1550 as a Tool for Radiation Protection in Space Exploration. *Life*, 11, 54.
- Ronnett, G. V., Ramamurthy, S., Kleman, A. M., Landree, L. E., Aja, S. 2009. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. 109: 17-23.
- 1555 Russell, R. L., O'Neill, P. H., Epperson, L. E., Martin, S. L. (2010). Extensive use of torpor in 13-lined ground squirrels in the fall prior to cold exposure. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(8), 1165–1172.
- Ryazanov, A. G., Shestakova, E. A., Natapov, P. G. 1988. Phosphorylation of elongation factor 2 by EF2 kinase affects rate of translation. *Nature*. 334: 170–173.
- 1560 Seldin, M. M., Tan, S. Y., Wong, G. W. (2014). Metabolic function of the CTRP family of hormones, Review in endocrine and metabolic disorder, 111–123.
- 1565 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.
- Sharapov, VM. 1984. Influence of animal hibernation on the development of mycoses. *Mycopathologia*. 84 :77-80.
- 1570 Sheriff, M. J., Williams, C. T., Kenagy, G. J., Buck, C. L., Barnes, B. M. 2012. Thermoregulatory changes anticipate hibernation onset by 45 days: data from free-living arctic ground squirrels. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182(6), 841-847.
- 1575 Storey, K.B., Heldmaier, G., Rider, M.H. 2010. Mammalian Hibernation: Physiology, Cell Signaling, and Gene Controls on Metabolic Rate Depression. In: Lubzens, E., Cerda, J., Clark, M. (eds) *Dormancy and Resistance in Harsh Environments. Topics in Current Genetics*, vol 21. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 1580 Storey, K. B., Storey, J. M. 2004. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biological Review*. 79(1) :207-33.
- 1585 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.

- Tøien, Ø., Blake, J., Edgar, D.M., Grahn, D. A., Heller, H. Craig., Barnes, B. M. 2011. Hibernation in Black Bears: Independence of Metabolic Suppression from Body Temperature. *Science* 331:906-909.
- 1590 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. *Molecular and cellular biology*, 13(3), 1516–1521.
- Tupone, D., Madden, C. J., Morrison, S. F. 2013. Central activation of the A1 adenosine receptor
1595 (A1AR) induces a hypothermic, torpor-like state in the rat. *Journal of Neuroscience*. 33(36):14512-25.
- Tang, Z., Yuan, L., Gu, C., Liu, Y., Zhu, L. 2005. Effect of exercise on the expression of adiponectin mRNA and GLUT4 mRNA in type 2 diabetic rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 25(2), 191-193, 201.
- 1600 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. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature*. 583(7814):109-114.
- 1605 To, K., Yamaza, H., Komatsu, T., Hayashida, T., Hayashi, H., Toyama, H., Chiba, T., Higami, Y., Shimokawa, I. 2007. Down-regulation of AMP-activated protein kinase by calorie restriction in rat liver. *Experimental Gerontology*. 42(11):1063-71.
- Turbill, C., Bieber, C., Ruf, T. 2011. Hibernation is associated with increased survival and the
1610 evolution of slow life histories among mammals. *Proceeding of the Royal SocietyB: Biological Science*.278(1723):3355-63.
- Witters, L. A., Kemp, B. E., Means, A. R. 2006. Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends in Biochemical Science*. 31:13–16.
- 1615 Wei, Z., Peterson, J. M., Wong, G. W. 2011. Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation of AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 15652–15665.
- 1620 Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai,

R., Kahn, B. B., Kadowaki, T . 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. 8: 1288–1295.

1625 Zimova, M., Hackländer, K., Good, J. M., Melo-Ferreira, J., Alves, P. C., Mills, L. S. 2018. Function and underlying mechanisms of seasonal colour moulting in mammals and birds: what keeps them changing in a warming world?. *Biological Reviews*, 93(3):1479-1498.

1630