

シリアンハムスターにおける  
低温ショックタンパク質の発現調節に関する研究

2019年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(岐阜大学)

堀 井 有 希

シリアンハムスターにおける  
低温ショックタンパク質の発現調節に関する研究

堀井 有希

## 略語一覽

aCSF	artificial cerebrospinal fluid 人工腦脊髓液
CHA	N6-cyclohexyladenosine
CIRP	cold-inducible RNA-binding protein
HP	Hibernation protein
ORF	open reading frame
RBM3	RNA-binding motif 3
RNP	ribonucleoprotein
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SD	Standard deviation 標準偏差

## 緒言

ヒトを含む多くの哺乳動物は体温恒常性を持ち、外部温度が変化しても深部体温を一定に保っているため、安定した活動を維持することができる。一方、ハムスターやリス、ヤマネなどの一部の小型げっ歯類は、体温恒常性を持っているにもかかわらず、餌が不足し気温が低下する環境下において、自ら体温を環境温度に近いレベルにまで下げる (39)。この現象を冬眠という。冬眠動物は、冬眠を行うことによって体温を維持するためのエネルギー消費を抑えていると理解されている。冬眠を行わない多くの哺乳動物は、何らかの原因により深部体温が低下した場合には、心拍動を維持することができずに死に至る。例えば、ヒトでは体温が 27°C を下回ると、律動的な心拍動を維持することができず、多くの場合心停止を起こすことが知られている (30)。一方、冬眠動物は、冬眠時、体温が 10°C 以下に達するにもかかわらず、心拍動や呼吸といった生命活動を維持することができる。このことから、冬眠動物は低体温に耐える特殊な機構を保有していると考えられる。

一般的に、低温時には、細胞内の様々な酵素の活性が低下し、代謝機能が低下する。このことにより医療分野においては様々なメリットが期待できる。実際に低体温は、心筋梗塞、脊髄損傷、脳梗塞や脳外傷、臓器移植、消化管虚血などからの予後を改善することが報告されており、その有効性が証明されている (10, 20, 43, 48)。また、がんや感染症などの進行を抑制するのにも低体温が有効であると考えられている (57, 58)。重篤な障害の残る可能性の高い疾患である新生児脳症においても、低酸素により引き起こされる脳障害を緩和するため脳または全身を冷却する低体温療法が注目されつつある (16, 44)。しかしながら、ヒトを含む冬眠を行わない多くの哺乳動物は極度に体温が低下すると生命活動を維持できない。したがって、低体温のメリットを十分に医療応用す

るに至っていない。そこで、冬眠動物の持つ低体温耐性のメカニズムを解明し、ヒトを含めた非冬眠動物に適用することができれば、低体温のメリットを医療応用できると期待した。

本研究では、冬眠動物における低体温耐性のメカニズムを解明する糸口として、低温ショックタンパク質に着目した。同タンパク質は低温などの細胞ストレスによって誘導されるタンパク質ファミリーである (28, 63, 64)。低温ショックタンパク質として同定され、構造ならびに機能の解析が進んでいるものとして、Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) と RNA-binding motif3 (RBM3) が挙げられる。これらのタンパク質は、N 末端側に RNA 結合ドメインを、C 末端側にアルギニングリシンリッチドメインを持つ。また、CIRP 及び RBM3 は、ヒト (6, 35) やマウス (7, 36) , ラット (9, 60) など多くの動物種において、様々な臓器に発現していることが報告されている。さらに注目すべきことに、小型げっ歯類であるジリス (56, 61) , 大型哺乳動物であるクマ (11, 12) といった冬眠する哺乳動物に着目し、網羅的な遺伝子解析を行った研究において、脳、心臓、肝臓及び筋肉での冬眠中の RBM3 の発現の上昇が報告されている。また、CIRP 及び RBM3 は RNA 結合タンパク質として、RNA の 5'または 3'非翻訳領域やポリアデニル化領域に結合することにより様々な遺伝子の転写後調節に関与していることが知られている (29, 65)。例えば、マウスやヒトの細胞を用いた研究では、3'非翻訳領域に結合した CIRP 及び RBM3 によりサーカディアン遺伝子のポリアデニル化が調節される (28)。また、精巣では、CIRP が翻訳調節や抗酸化作用などに関連するいくつかの mRNA に結合し、安定性を高めている (58)。RBM3 は miRNA に結合することにより、網羅的なタンパク質の翻訳に影響を与えていることが報告されている (9)。さらに、これらのタンパク質には、TNF- $\alpha$  や過酸化水素、成長因子の剥奪などに引き起こされるアポトーシスを抑制する機能があることも明らかとなっている (5, 25, 40, 62, 65)。低温

で培養したマウスの脳スライス標本においては、RBM3は神経幹細胞の生存期間を延長すると報告されている(51)。このように、低温ショックタンパク質は低温時に発現を上昇させること、また、細胞保護効果をもつこと、というふたつの特徴が挙げられる。これらの特徴により、同タンパク質は極度の低体温時において、生命活動を維持するために保護機能を発揮する可能性があると考えられる。RBM3については冬眠する哺乳動物における発現の上昇が報告されているものの、CIRPについては未だ報告がない。そこで、本研究では、低温ショックタンパク質のうちCIRPに着目し、冬眠動物における発現動態を明らかにすること、また、非冬眠動物への応用可能性を見出すことを目的とした。

本研究では冬眠動物として、シリアンハムスターを用いた。冬眠動物において、自発的に冬眠を誘発させるためには、冬のような短日及び寒冷環境下で飼育することが必須である。このような環境下で馴化することにより、冬眠動物は、自発的な冬眠に必要な様々な遺伝子を変化させている。小型げっ歯類であるシリアンハムスターは、実験室内であっても冷蔵庫内で短日及び寒冷環境を再現することにより自発的な冬眠を誘発できる。また、冬眠時には冬眠動物の脳内でアデノシン A1 受容体が賦活化されることにより、体温が低下する(50)。シリアンハムスターは、人為的にアデノシン A1 受容体アゴニスト (CHA) を脳室内投与することにより、冬眠様の低体温へ誘導する方法が確立されている(31, 50)。このような特徴を利用して、本研究では冬眠動物としてシリアンハムスターを用いた。

第1章では、シリアンハムスターにおける CIRP 遺伝子の平常時と自発的な冬眠時の発現を解析し、発現に特徴的な変化が存在するのかどうか検討した。第2章では、冬眠時の CIRP 遺伝子の発現調節を引き起こす要因を明らかにするために、冬眠時の飼育環境と、体温低下に着目し、検討した。第3章では、冬眠時の CIRP 遺伝子発現様式は非冬眠動物へ応用できるのかどうかを明らかに

するために、冬眠しない動物であるマウスとラットにおける CIRP 遺伝子の発現を解析し、冬眠動物と同様に変化するかどうか検討した。

## 実験材料及び実験方法

### 実験動物

実験には体重 108 g-164 g, 9-26 週齢の雄シリアンハムスター, 体重 34-44 g, 8-12 週齢の ddY 系統の雄マウス及び 体重 257-388 g, 8-12 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系統の雄ラットを用いた。すべての動物は日本 SLC (静岡, 日本) から購入した。実験動物は以下の実験に供するまで, 室温 22°C, 明暗周期 12 時間 : 12 時間 (明期 7:00-19:00) に設定された環境で飼育し, 餌は MF (オリエンタル酵母, 東京, 日本) を与えた。餌と水は自由に摂取できるようにした。

本研究における動物実験は全て, 岐阜大学動物実験委員会で認可されたものであり, 岐阜大学動物実験取扱規程に従って実施した (承認番号: 15096, 16030, 17015)。

### 冬眠動物の作出

本研究では, シリアンハムスターを実験室内で自発的な冬眠へ誘導した。秋から冬の環境を再現するため, シリアンハムスターを 4-5°C の冷蔵庫内で, 明暗周期 8 時間 : 16 時間 (明期 18:00-2:00) にて飼育した。低温環境ではシリアンハムスターは 1 匹ずつ個別飼育とした。接触せずに体温を測定するため, テレメトリーシステム (DAS-7007; BioMedic Data Systems, デラウェア, 米国) を用いた。ハムスターにはトランスポンダー (IPTT-300; BioMedic Data Systems) を背部肩甲骨間の皮下に埋め込んだ。体温測定の際には, リーダーシステム (DAS-7007; BioMedic Data Systems) をハムスターにかざすことにより, ハムスターに接触せずに体温を計測した。ハムスターは, 1 ヶ月間寒冷環境及び明暗周期に馴化させてから, 飼料を制限した。飼料を制限してからは 10:00 及び 18:



00 に体温を測定した。ハムスターの体温が 15°C 以下となり、目視による活動停止、接触刺激に対する忌避行動の消失及び体を丸めた体勢が見られた場合、冬眠を行っているとは判定した。冬眠作出法は、4 匹のハムスターを同時に適用した。冬眠したハムスターは冬眠群として採材した。これらは第 1 章にて自発的な冬眠時の CIRP 遺伝子発現を調べるための解析に使用した。4 匹のうち 2 または 3 匹のハムスターが冬眠を行った時点で、同じタイミングで冬眠作出法を適用しているにもかかわらず冬眠していないハムスターを、寒冷及び短日環境飼育群として採材した。これらは第 2 章にて、低体温とはならないものの冬眠を行うような環境へ馴化したことによる CIRP 遺伝子発現への影響を調べるための解析に使用した。

#### アデノシン A1 アゴニストによる人為的低体温の作出

第 2 章では、冬眠前の変化を経ずに冬眠様の低体温導入のみを人為的に再現し、CIRP 遺伝子の発現への影響を検討した。そのため、冬眠時の体温低下に寄与しているアデノシン A1 受容体のアゴニストである CHA を用いて低体温へ誘導したハムスターを作出した。22°C の環境温度にて飼育しており寒冷馴化していないハムスターに、アデノシン A1 アゴニスト N6-cyclohexyladenosine (CHA) (Sigma, ミズーリ, 米国) を脳室内投与した。加えて、外部から冷却することによって、人為的に低体温へ導入した。脳室内投与のため、ハムスターにはガイドカニューレ (AG-6; エイコム, 京都, 日本) を留置した。留置の際には、ハムスターにケタミン (200 mg/kg) 及びキシラジン (10 mg/kg) を混合し、腹腔内投与することにより全身麻酔を行った。麻酔したハムスター頭部の毛を刈り、脳固定装置 (SR-6N; Narishige Scientific Laboratory, 東京, 日本) に固定した。ハムスターの頭蓋骨を露出し、ブレグマの座標を測定した。ハムスターの脳地図

(33)を参照し、ガイドカニューレを右側脳室(-0.3 mm AP, 2.6 mm L, 4.0 mm DV)に挿入した。露出した頭蓋骨にネジを2本埋め込み、ガイドカニューレとネジを、デンタルセメントを用いて固定した。ガイドカニューレ内にはダミーカニューレ(AD-6; エイコム)を留置した。また、体温を測定するため、体温測定用トランスポンダーを腹腔内に埋め込んだ。術後、人為的な低体温に誘導するまで、ハムスターには少なくとも1週間の回復期間をおいた。CHAは人工脳脊髄液(aCSF; in mM: 13.9 NaCl, 0.5 KCl, 0.13 MgSO<sub>4</sub>, 0.24 CaCl<sub>2</sub>, 0.124 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 NaHCO<sub>3</sub>, 1 glucose)に溶解した。人為的な低体温に誘導するため、マイクロインジェクションカニューレ(AMI-6; エイコム)をガイドカニューレに挿入し、5 μLの液量となるように調整した1 nmolのCHAを投与した。投与の際はハムスターを22°Cに保温したプレート上においた。体温が32°C付近まで低下してからは冷蔵庫に移動させた。ハムスターの体温が低下し、接触に対する忌避反応が消失してからは、持続的に体温を測定するために体温計測用プローブ(ML312; AD Instruments)を肛門から2 cmに挿入した。プローブで計測される体温が10°Cに達した時点でハムスターを安楽殺し、組織を採材した。実験中は、プレート温度、冷蔵庫内温度、トランスポンダー温度及び体温プローブ温度をPower Lab(AD Instruments, シドニー, オーストラリア)を介してコンピューターへ経時的に記録した。

また、第2章では、低体温の影響を除いたCHA投与自体によるCIRPの選択的スプライシングへの影響を調べた。そのため、CHAを投与後、体温を37°Cに維持した群を作出した。本実験ではCHAを投与する際、ハムスターを35-38°Cに保温したプレートの上においた。トランスポンダーにより体温を測定しながら、プレートの温度を適宜調節した。CHAを投与してから4時間後にハムスターを安楽殺し、組織を採材した。

## イソフルラン吸入麻酔薬による人為的低体温の作出

第2章ではシリアンハムスター、第3章では ddY 系マウス及び SD 系ラットを使用し、アデノシン系の賦活化を介さず、低温そのものが CIRP 発現に及ぼす影響を検討した。そのため、動物に、麻酔薬を作用させ、体温調節を行わない状態で外部から冷却した。実験には、22°Cの環境温度にて飼育しており寒冷馴化していない動物を用いた。この方法により、動物は冬眠時に引き起こされるアデノシン系の賦活化を介さず、強制的に低体温へ導入される。麻酔薬には体内からの排出の速い吸入麻酔薬のイソフルラン（フォーレン®吸入麻酔液; Abbot japan, 東京, 日本）を用いた。体温プローブを肛門から 2 cm まで挿入し、直腸温度を測定した。さらにラット用心電図電極（ユニークメディカル, 東京, 日本）を用いて、増幅器 (DAM50 Differential Amplifier; World Precision Instrument, フロリダ, アメリカ) を介して心電図を測定した。体温を低下させる際には、まず、平常体温を呈する動物をイソフルラン（濃度 2%, 流速 2.0 L/min）を流入させているボックスに移動させ、不動化した。そして速やかに体温プローブと心電図プローブを装着し、各実験による温度条件へ移動させた。移動に伴い、イソフルランの吸入はマスクの装着により行った（流速 1.5 L/min）。実験中は、動物の直腸温、心電図及び冷蔵庫内温度を Power Lab を介してコンピューターへ経時的に記録した。

本方法では、動物の体温低下に伴い心拍数が低下する。そして、麻酔をかけ続けた場合には最終的に心拍動が停止する。そのため、心拍動を指標に段階的にイソフルランの濃度を下げた。イソフルランの濃度は心拍 > 300 回/min の時にイソフルラン濃度 2%, 心拍 200-300 回/min の時に 1.5%, 心拍 150-200 回/min の時に 1.0%, 心拍 100-150 回/min の時に 0.5%, 心拍 < 100 回/min となった時 0% とした（図 1）。イソフルラン濃度を下げた後、心拍数が上昇した時には、一度

イソフルラン濃度を上げ、再度心拍が低下してからイソフルラン濃度を下げた。

第2章及び第3章では、軽度な低体温による CIRP 遺伝子の発現への影響を調べるため、体温を 28°C で維持した群を作成した。実験では、まず 25°C に設定したプレートの上で動物を冷却した。動物の体温が 28°C に達したらプレートの温度を 28°C の設定に変更した。体温を観察しながら、プレートの温度を適宜調節した。ハムスターを用いた実験では 2 時間、マウスを用いた実験では 1 時間、体温を  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  にて維持した。28°C にて維持後速やかに安楽殺し組織を採材した。

第2章では、ハムスターにおいて、軽度な低体温による CIRP 遺伝子発現の変化が、冬眠様の極度の低体温においても維持されるのかどうかを検討した。そのため、体温を 28°C で維持した後、10°C まで急冷した群を作成した。実験では、体温を 28°C にて 2 時間維持した後、速やかに 4-5°C の冷蔵庫内へ移動し、体温が 10°C になるまで冷却を続けた。ハムスターの体温が 10°C に達した時点で安楽殺し、組織を採材した。

また、第2章及び第3章では、軽度な温度域を素早く通り過ぎるように低体温へ誘導することによる CIRP 遺伝子発現への影響を解析した。そのため、体温を 10°C または 15°C まで急冷した群を作成した。実験では、動物は麻酔を吸入させ不動化した後、速やかに 4-5°C の冷蔵庫内へ移動し、体温が 10°C または 15°C になるまで冷却を続けた。第2章において、ハムスターは体温が 10°C に達した時点で安楽殺し、組織を採材した。第3章においてマウスは、体温が 15°C に達した時点で安楽殺した。

さらに、第2章では、軽度な低体温を経験しない場合の、極度な低体温による CIRP 遺伝子発現への影響を検討した。そのため、ハムスターを用いて、体温を 10°C まで急冷後 6 時間維持した群を作成した。実験では、ハムスターは麻酔を吸入させ不動化した後、速やかに 4-5°C の冷蔵庫内へ移動し、体温を 10°C まで冷却した後、冷蔵庫温度を  $8 \pm 4^\circ\text{C}$  に設定し、低体温状態を維持した。6 時間後に

安楽殺し，組織を採材した。

第3章では，マウスにおいて，低体温の影響を除いた麻酔自体による CIRP の選択的スプライシングへの影響を調べた。そのため，イソフルランを吸入後，体温を 37°C に維持した群を作出した。本実験では麻酔を吸入させ不動化した後，速やかにマウスを 35-38°C に保温したプレートの上においた。体温を測定しながら，プレートの温度を適宜調節した。イソフルランを吸入してから 2 時間後にマウスを安楽殺し，組織を採材した。

### シリアンハムスターの平常体温時における陰嚢内温度の測定

無処置のシリアンハムスターにイソフルランを吸入させ麻酔したのち，温度計測用のトランスポンダーを陰嚢内に挿入した。陰嚢内で計測された温度は精巢の温度を反映していると考えた。また，同時に腹腔内に別のトランスポンダーを挿入し，腹壁に縫合糸を用いて固定した。術後 1 週間は回復期間とした。室温 22°C，明暗周期 12 時間：12 時間（明期 7:00-19:00）に設定された環境で飼育し，餌と水は自由に摂取できるようにした。陰嚢内及び腹腔内の温度を 1 日 1 回，明期にて合計 7 日間計測した。

### 寒冷環境に馴化したマウスの作出

第3章では，マウスにおける寒冷刺激による CIRP 発現への影響を明らかにするため，マウスを 4-5°C の冷蔵庫内で 1 週間飼育し，寒冷環境飼育群を作成した。低温環境でマウスは 1 匹ずつ個別飼育とし，餌と水は自由に摂取させた。

## 組織の採材

平常体温時のシリアンハムスター、マウス及びラット、冬眠時のシリアンハムスターの脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び精巣を採材した。また、人為的低体温時、短日・寒冷条件にて飼育し非冬眠時の動物の脳及び心臓を採材した。採材の際には、動物にイソフルラン麻酔を施し、頸動脈から放血殺した。臓器は Krebs's 液 (in mM: 118.05 NaCl, 4.69 KCl, 2.52 CaCl<sub>2</sub>, 1.16 MgSO<sub>4</sub>, 1.16 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 NaHCO<sub>3</sub>, 1.11 Glucose) で洗浄した後、液体窒素中で急激に冷凍した。CIRP 遺伝子の解析 (後述) を行うまでは、-80°C の冷蔵庫内で保存した。

## RNA 抽出及び cDNA の作成

-80°Cにて保存した脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び精巣の組織片約 50 mg から、RNA 抽出キット (TRIZOL® Reagent; Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本または TRI Reagent; Molecular Research Center, Inc., オハイオ, 米国) を用いて、トータル RNA を抽出した。一部のサンプルについては TURBO™ DNase enzymes (Thermo Fisher Scientific) を用いて、混入したゲノム DNA の除去を行った。得られた RNA サンプルの 260 nm の波長における吸光度を吸光度計 (Spectrophotometer; HITACHI, 東京, 日本) により測定した。測定された吸光度をもとに RNA の濃度を算出した。トータル RNA 3 μg から逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応は、ランダムプライマー (Thermo Fisher Scientific), 逆転写酵素 (Super ScriptIII® Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific) を用いて、サーマルサイクラー (GeneAmp® PCR System 2700; Thermo Fisher Scientific) にて行った。

## プライマーの作成

既に報告のあるヒト (NM\_001280.2) , マウス (NM\_007705.2) , ラット (NM\_031147) の CIRP mRNA の共通配列を参考にして, CIRP 遺伝子の転写物の検出のために用いるプライマーを作成した。そのために, 予想される開始コドンを含むプライマーを使用した。Forward プライマーを Cirp1 (F) , reverse プライマーを Cirp (R) として表 1 に示した。さらに, ハムスターの CIRP の open reading frame (ORF) 全長を解析するために, 予想される ORF より上流及び下流の配列に相補的なプライマーを作成した。プライマーはマウス及びラットの配列を参考に作成した。ORF 全長のシーケンス解析に使用した forward プライマーを Cirp2 (F) , reverse プライマーを Cirp2 (R) として表 1 に示した。

## PCR 法

Taq ポリメラーゼ (Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, ライフテクノロジー) を用いて, cDNA 反応液 1  $\mu$ L から PCR を行った。サーマルサイクラーを用いて, 初期変性 94°C 2 分, つづいて 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分にて, 28–35 サイクル (後述) , その後 72°C 3 分の温度設定にて目的の配列を持つ cDNA を増幅した。反応液の液は 0.4  $\mu$ g/mL のエチジウムブロマイド (ナカライテスク, 京都, 日本) を含む 1.5%アガロースゲル (ナカライテスク) を用いて電気泳動を行った。電気泳動したゲルには, 紫外線トランスイルミネーター (UVP Laboratory Products, カリフォルニア, 米国または ChemiDoc™ XRS+ system; BIO RAD, カリフォルニア, 米国) によって紫外線を照射し, 反応生成物を可視化した。ハムスターを用いた実験における PCR 反応のサイクル数は, cDNA の由来の臓器によって一定とした。これらのサイクル数を設定するために, いくつかのサンプルで 25-40 サイクルの PCR を行い, 検出されるバンドのパタ

ーンに違いがないことを確認した。そして、PCR 産物の増幅曲線がプラトーに達さないサイクル数を採用した。ハムスターにおいては、脳：28 サイクル、心臓：29 サイクル、肺：28 サイクル、肝臓：35 サイクル、腎臓：29 サイクル、精巣：30 サイクルに設定した。マウス及びラット由来の cDNA においては全ての臓器で 30 サイクルに設定した。

### 塩基配列の解読

RT-PCR により増幅した CIRP cDNA の塩基配列を解読した。ハムスターの平常体温時及び冬眠時、マウスの平常体温時の心臓に由来する RNA から作成した cDNA 液を、Cirp1 (F) 及び (R) を用いて増幅させた。電気泳動した後、アガロースゲル上の目的のバンドの部分の PCR 産物を切り出し、ダイレクトシーケンシング法を行った。PCR 産物はシリカメンブレン法 (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL, デューレン, ドイツ) にて精製した。精製物の一部を再度電気泳動し、目的のバンドのみが精製されていることを確認した後、キット (ABI Prism® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits, Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンシング反応を行った。サーマルサイクラーの温度設定は、96°C 1 分、つづいて 96°C 10 分、50°C 5 分、60°C 4 分を 25 サイクルにて反応を行った。その後プライマーを除去し、DNA 断片を精製した。精製した断片の解読は、マルチキャピラリー-DNA シーケンサー (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific) を使用した。

その後、ORF 全長を解析するために、予想される ORF より上流及び下流の配列に相補的なプライマー Cirp2 (F) 及び Cirp2 (R) によって増幅した PCR 産物においてシーケンシング解析を行った。Cirp1 (F) 及び (R) によって解読した配列が含まれることを確認し、ハムスター及びマウスから検出された cDNA 配列



を決定した。

### 画像の数値化及び統計処理

得られた PCR 画像は Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, メリ  
ーランド, 米国) を用い, 蛍光強度をバンド毎に数値化した。一つのサンプルか  
ら得られたバンドのうち, 800 bp 付近のバンドを long form, また 500 bp 付近の  
バンドを short form とした。Long form の数値を short form の数値で割ったもの  
を long form/short form として算出し, 発現量の比を示した。

得られた数値データは全て平均値  $\pm$  標準偏差 (Standard deviation; SD) で表記  
した。2 群間の検定は, Student's t 検定または Welch's t 検定を用いた。2 群以  
上での検定は, Dunnett's 検定を用いた。 $P$  値  $< 0.05$  の場合を統計学的に有意な  
差があるとした。統計解析には Statcel4 ソフトウェア (OMS, 埼玉, 日本) を  
用いた。

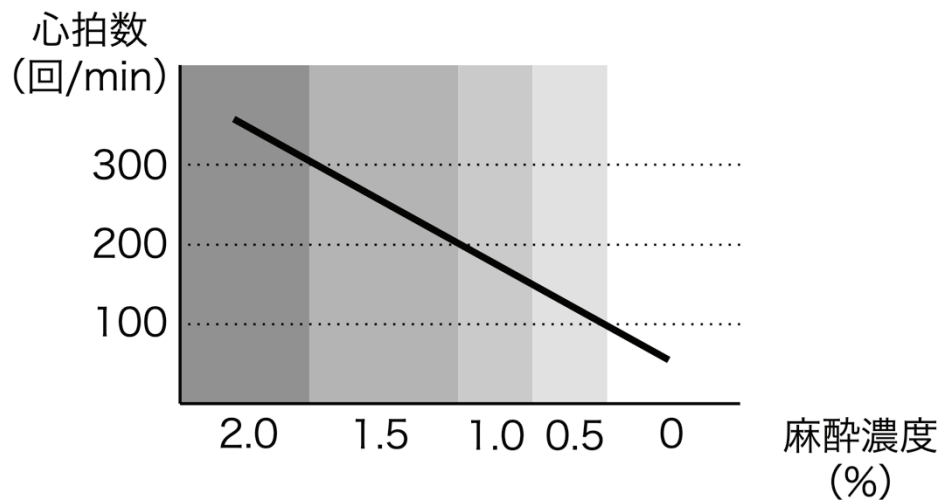


図1：心拍数によるイソフルラン濃度の調節

イソフルランを用いてシリアンハムスターを人為的に低体温へ誘導する際には、心拍数を指標にして、吸入させるイソフルランの濃度を調節した。心拍数 >300 回/min のときはイソフルラン濃度を 2%とした。同様に、心拍数 200-300 回/min のとき 1.5%、心拍数 150-200 回/min のとき 1.0%、心拍数 100-150 回/min のとき 1.0%、心拍数 <100 回/min のときには 0%とした。

プライマー	配列 (5' → 3')
Cirp1 (F)	GCCATGGCATCAGATDAAGGCA
Cirp1 (R)	GCTTTTACTCGTTGTGTGTA
Cirp2 (F)	TCAGGGACCTGCCCGACTCA
Cirp2 (R)	AACGTTTCAGCGAAGCTCCC

表 1 : 実験に使用したプライマー

プライマーは、ヒト、マウス及びラットの CIRP mRNA の共通配列から作成した。Cirp1 の forward 及び reverse プライマーはそれぞれ開始コドン及び終止コドンを含む。Cirp2 プライマーは予想される ORF の外側の配列に結合する。Forward プライマーを (F) , reverse プライマーを (R) と示す。

## 第 1 章

### シリアンハムスターの冬眠時における CIRP 遺伝子発現の解析

冬眠動物は、冬眠中に極度の低体温となるにもかかわらず、致命的な障害はない。本実験で使用したシリアンハムスターにおいても、冬眠中の低体温時に心臓は規則正しい洞律動を保っていることが知られている (30)。このことから、シリアンハムスターの冬眠中には、低温による障害を回避するための機構が存在していると考えられる。本研究では、障害を回避するための機構のひとつとして CIRP 遺伝子に着目した。冬眠中に CIRP が機能を発揮するとすれば、シリアンハムスターの冬眠中には平常時と比較して CIRP 遺伝子の発現が上昇していると考えられる。また、シリアンハムスターの CIRP 遺伝子の報告は未だなかったため CIRP 遺伝子の発現があるのかどうかを明らかにする必要がある。そこで、本章では、シリアンハムスターにおける平常時の CIRP 遺伝子の発現状態を明らかにすること、また、冬眠時に CIRP 遺伝子の発現が変化するのかどうかを明らかにすることを目的とした。

## 結果

### 平常体温群のシリアンハムスターにおける CIRP mRNA ホモログの確認

平常体温群のシリアンハムスターの脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓において、RT-PCR 法により CIRP 遺伝子発現を検索したところ、全ての臓器において、1組のプライマーから約 500 bp, 700 bp, 800 bp の3つのサイズの PCR 産物が増幅された(図2)。約 500 bp の産物を short form, 約 700 bp の産物を medium form, 約 800 bp の産物を long form とした。ゲノム DNA の混入の有無を確認するため、一部のサンプルについては DNase 処理をした RNA 液から作成した cDNA で PCR 反応を行った。DNase 処理後の RNA から作成した cDNA サンプルにおいても、同様に3種類の PCR 産物が増幅された。

心臓から増幅された PCR 産物を用いて、シーケンス解析を行ったところ、short form の予想される ORF 配列は、マウス、ラット及びヒトで報告されている CIRP mRNA の ORF 配列と高い相同性を有していた。相同率はマウスで 94%、ラット 93%、ヒト 89%であった(図3)。また、ORF からアミノ酸配列を予想した。ハムスターと他動物種とのアミノ酸配列の相同率は、マウス 99.4%、ラット 98.8%、ヒト 95.9%であった(図4)。したがって、short form として検出された mRNA は、CIRP mRNA のホモログであると確認された。

また、約 800 bp の PCR 産物(long form)の予想される ORF は、short form と ORF の開始点から 502 bp は完全に一致していた。一方、3' 末端側の配列に 212 bp の塩基配列が挿入されていた。ヒト CIRP mRNA のエキソンを参考に、エキソン構造を予想したところ、long form の配列は、ハムスター CIRP mRNA ホモログの第6エキソンと第7エキソンの間に CIRP mRNA のイントロンにあたる配列が挿入された形であることが明らかとなった(図5)。この第6エキソンと第7エキソンの間にイントロンにあたる配列が存在するという構造は、マウス及び

ヒトにおいて報告のある転写バリエント (XM\_006513165.1) 及び (NM\_001300829.2) と一致していた。ハムスターにおいて、挿入された配列には stop コドンが存在した。したがって、long form の配列から予想されるアミノ酸は、CIRP とは C-末端の異なるものである可能性が示唆された。

約 700 bp の PCR 産物 (medium form) については、ダイレクトシーケンス解析を試みたが、産物の量が short form や long form と比較して少量であり、配列を決定することができなかった。

### 冬眠群のシリアンハムスターにおける CIRP mRNA 発現

冬眠群のシリアンハムスターの脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓における CIRP mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。全ての臓器において、冬眠群では単一サイズの約 500 bp の mRNA に発現が集約し、その他のスプライシングバリエントの発現が減少することが明らかになった (図 6)。塩基配列を解析したところ、約 500 bp の増幅産物の配列は、平常体温群で検出された 3 種類の産物のうち short form のものと完全に一致していた。

### 平常体温群と冬眠群のシリアンハムスターにおける CIRP mRNA 発現の比較

平常体温群及び冬眠群の CIRP mRNA 解析において検出された short form 及び long form のバンドの蛍光強度を数値化し、short form と long form の発現量の比を long form/short form として算出した。平常体温群及び冬眠群の数値を比較したところ、脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓において、冬眠群では平常体温群に対して、long form/short form は有意に減少した (図 7)。つまり平常体温群では short form とともに long form が発現していたが、冬眠群では short form に発現が集約したことが明らかになった。

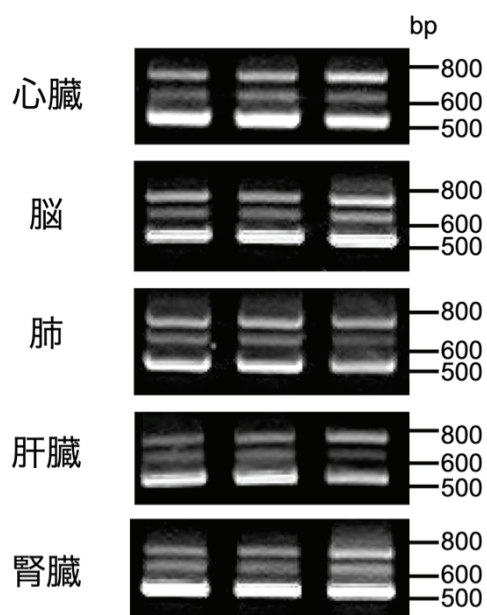


図 2：平常体温群のシリアンハムスターにおける CIRP mRNA 解析

平常体温群のシリアンハムスターの心臓，脳，肺，肝臓及び腎臓にて発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。脳：28 サイクル，心臓：29 サイクル，肺：28 サイクル，肝臓：35 サイクル，腎臓：29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカーの塩基対 (bp) を示す。約 500 bp の産物を short form，約 800 bp の産物を long form とした。代表として 3 匹のハムスターにおける結果を示す。

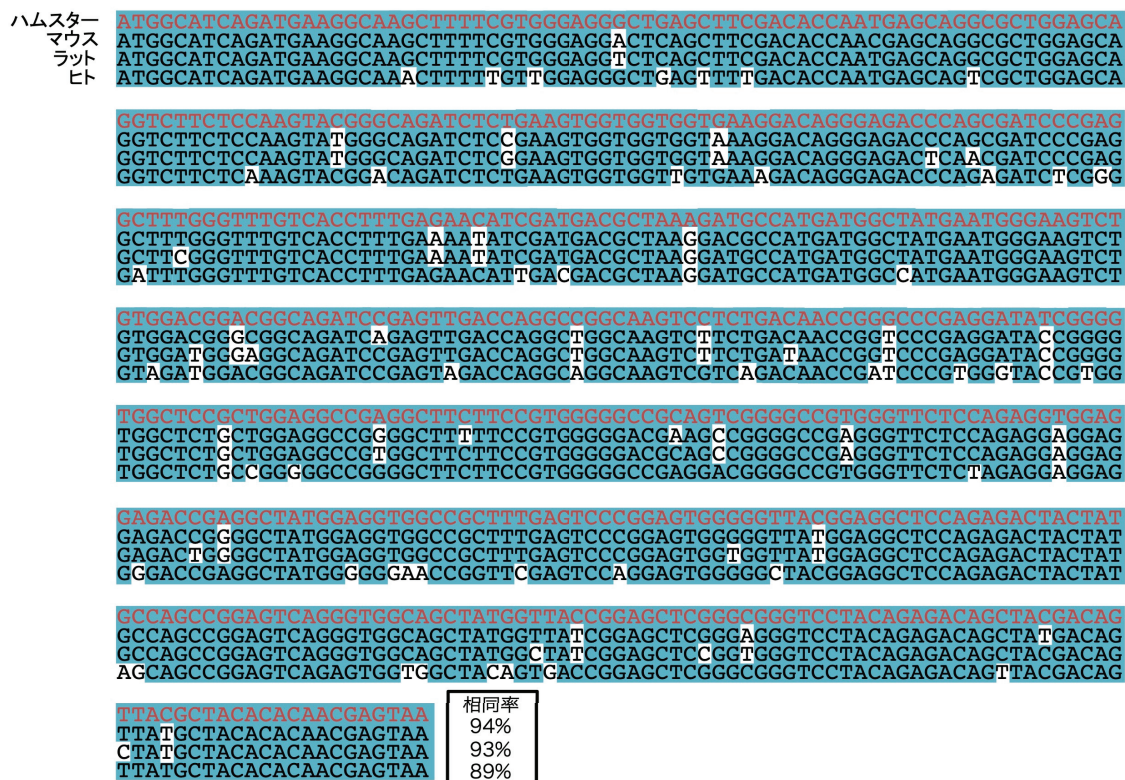


図 3 : Short form がコードする CIRP のホモログの  
オープンリーディングフレーム (ORF) における塩基配列

シリアンハムスターの心臓にて発現していた mRNA のうち, short form のオープンリーディングフレーム (ORF) の配列を示す。また, 既に報告のあるマウス, ラット, ヒトの CIRP の ORF 配列と比較した。ハムスターの塩基配列とマウス, ラット, ヒトの塩基配列との相同率はそれぞれ, 94%, 93%, 89%であった。



ハムスター	MASDEGKLFVGGLSFDTNEQALEQVFSKYGQISEV VVKDR
マウス	MASDEGKLFVGGLSFDTNEQALEQVFSKYGQISEV VVKDR
ラット	MASDEGKLFVGGLSFDTNEQALEQVFSKYGQISEV VVKDR
ヒト	MASDEGKLFVGGLSFDTNEQ SLEQVFSKYGQISEV VVKDR
	ETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGK SVDGRQIRVDQA
	ETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGK SVDGRQIRVDQA
	ETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGK SVDGRQIRVDQA
	ETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGK SVDGRQIRVDQA
	GKSSDNRRARGYRGG SAGGRGFFRGGRSRGRGFSRGGGDRGY
	GKSSDNRRARGYRGG SAGGRGFFRGGRSRGRGFSRGGGDRGY
	GKSSDNRRARGYRGG SAGGRGFFRGGRSRGRGFSRGGGDRGY
	GKSSDNRRARGYRGG SAGGRGFFRGGRSRGRGFSRGGGDWGY
	GKSSDNRRARGYRGG SAGGRGFFRGGRSRGRGFSRGGGDRGY
	GGGRFESRSGGYGGS RDYYASRSQGGSYGYRSSGGSYRDSY
	GGGRFESRSGGYGGS RDYYASRSQGGSYGYRSSGGSYRDSY
	GGGRFESRSGGYGGS RDYYASRSQGGSYGYRSSGGSYRDSY
	GGGRFESRSGGYGGS RDYYASRSQGGSYGYRSSGGSYRDSY
	GGNRFESRSGGYGGS RDYY SRSQGGYSDRSSGGSYRDSY
	DSYATHNE
	DSYATHNE
	DSYATHNE
	DSYATHNE

	相同率
	99.4 %
	98.8 %
	95.9 %

図4：Short form がコードする CIRP ホモログのアミノ酸配列

シリアンハムスターの心臓にて発現していた mRNA のうち、short form の ORF 配列から予想されるアミノ酸配列を示す。また、既に報告のあるマウス、ラット、ヒトの CIRP のアミノ酸配列と比較した。ハムスターのアミノ酸配列とマウス、ラット、ヒトのアミノ酸配列との相同率はそれぞれ、99.4%、98.8%、95.9%であった。

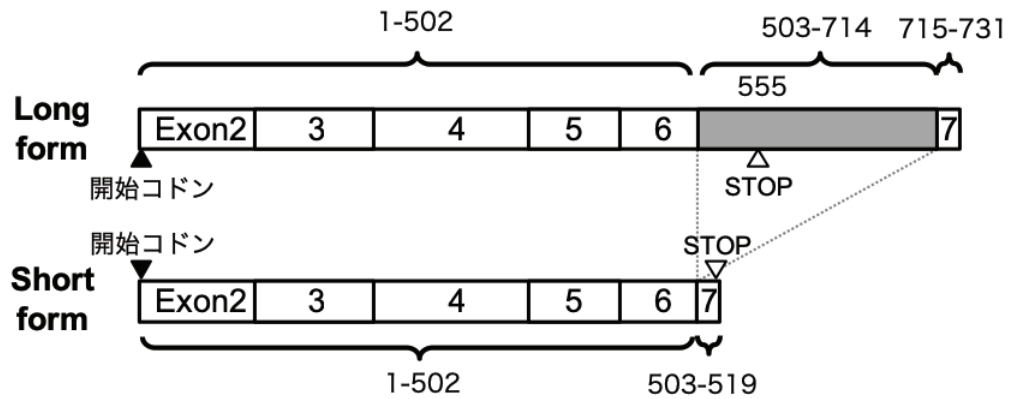


図 5 : シリアンハムスターにおける short form 及び long form のエクソン構造

ヒト CIRP mRNA のエクソン構造を参考に, short form と long form の構造を予想し, 比較した。▲は開始コドン, △は終止コドンを示す。数字は開始コドンからの塩基数を示す。グレーの四角で示す部分が, long form のうち short form と異なる配列である。

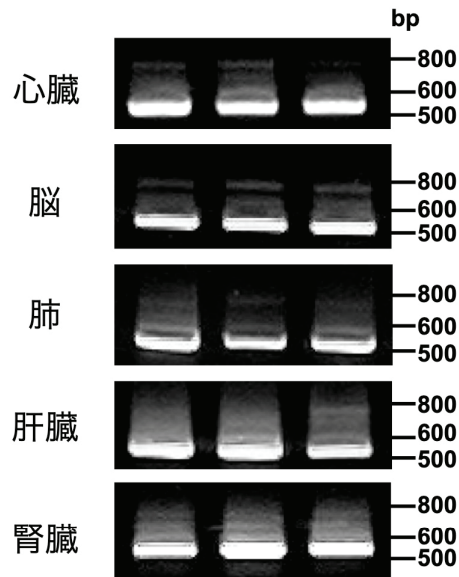


図 6：冬眠群のシリアンハムスターにおける CIRP mRNA 発現解析

シリアンハムスターの心臓，脳，肺，肝臓及び腎臓にて，冬眠中に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。図 2 と同様に脳：28 サイクル，心臓：29 サイクル，肺：28 サイクル，肝臓：35 サイクル，腎臓：29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹のハムスターにおける結果を示す。

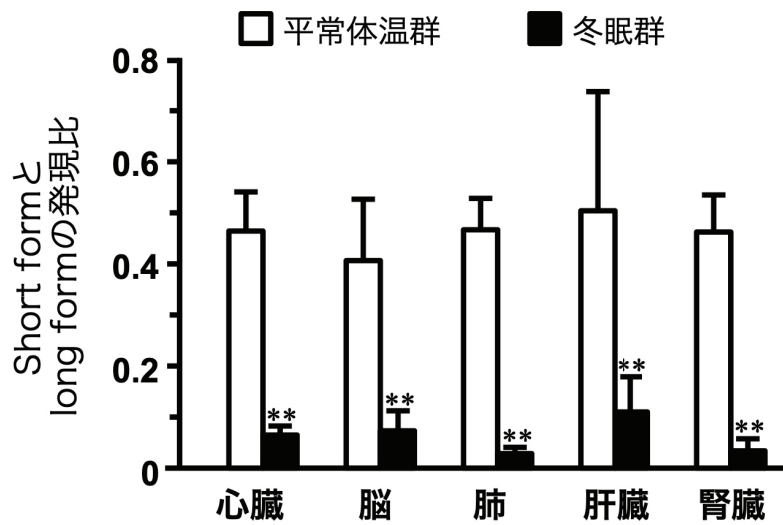


図 7：平常体温群と冬眠群のシリアンハムスターにおける CIRP のスプライシングバリエント発現の比較

平常体温群と冬眠群のシリアンハムスターにおけるスプライシングバリエントの発現を定量的に評価した。Short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を平均値 $\pm$ SD で示す。白のバーは平常体温群 (n=5) , 黒のバーは冬眠群 (n=5) のデータを示す。統計には Student's t 検定または Welch's t 検定を用いた。\*\*は平常体温群と比較して、冬眠群が統計的に有意であったことを表す (P < 0.01) 。

## 考察

低温ショックタンパク質は、低温時に発現が上昇することが明らかとなっている分子である (6, 7, 35, 36)。また、培養細胞を用いた研究により、低温ショックタンパク質には細胞を保護する作用があることが明らかにされている (5, 25, 39, 61, 64)。そこで、本研究では CIRP 遺伝子に着目し、冬眠動物の体内においても CIRP の発現が増加しているのではないかと予想した。そこで本章では、冬眠動物であるシリアンハムスターの CIRP 遺伝子の発現を解析した。本章の結果により、シリアンハムスターにおいて、平常体温時に CIRP ホモログをコードする mRNA が発現していること、また、複数のスプライシングバリエントが発現していることが明らかとなった。さらに、冬眠時には機能的な CIRP ホモログに mRNA の発現が集約することが明らかとなった。このことから、冬眠動物の冬眠時には CIRP 遺伝子の発現の単純な増加ではなく、選択的スプライシングの調節を介した、発現メカニズムが存在することが示唆された。

平常体温時のシリアンハムスターからは少なくとも 3 種類の PCR 産物が増幅された。そこで、PCR 産物の配列を解読した結果、short form と定義した約 500 bp の産物は、ヒト、マウス及びラットにおいて既に報告のある CIRP mRNA と高い相同性を示した。したがって、short form として検出された配列は CIRP のハムスターホモログである可能性が高い。ヒト CIRP では、RNA 結合部位である ribonucleoprotein (RNP) 1 及び 2 の配列や、その配列を含む RNA 結合ドメイン (アミノ酸 1-84 番) の配列が決定されている (35)。本研究で決定したシリアンハムスターの CIRP ホモログから予想されるアミノ酸配列は、ヒト CIRP と、RNP だけでなく RNA 結合ドメイン全域で大部分が一致した (図 8)。したがって、ハムスター CIRP も、ヒト CIRP と同様に、RNA 結合タンパク質として機能していると考えられる。

一般的に、タンパク質の発現を上昇させるためには、遺伝子の転写を促進することにより mRNA の量を増加させ、翻訳されるタンパク質の量を増加させるメカニズムが考えられる。一方、冬眠時のシリアンハムスターは、CIRP mRNA の発現を増加させるために必ずしも転写量を増加させる必要はないと考えられる。なぜなら、選択的スプライシングを変化させることのみで CIRP タンパク質の発現の効率を増加させられる可能性があるからである。冬眠時のように温度の低下する状況においては、様々な酵素活性が低下するため、転写レベルの変化はタンパク質の増加にあまり寄与できない可能性がある。そのため、選択的スプライシングの切り替えのみで必要なタンパク質の発現効率を上昇させる機構であるとすれば、大変有用である。今後、実際に CIRP 遺伝子の転写及び CIRP mRNA の発現量について定量し、選択的スプライシングの変化がスプライシングバリエーションの発現量にどのような影響を及ぼすのか明らかにする必要がある。

本章で明らかにした long form の配列は、short form の第 6 エキソンと第 7 エキシソンの間に、CIRP mRNA のイントロンに相当する配列が挿入される形であった。このことから、CIRP 遺伝子の発現には選択的スプライシングが行われており、long form は CIRP 遺伝子に由来するスプライシングバリエーションであると考えられる。そこで、long form がタンパク質へ翻訳された場合の機能を予測した。Long form がコードしていると予想されるアミノ酸配列は、RNA 結合ドメインで CIRP と完全に一致した。そのため、long form から翻訳されるタンパク質も CIRP タンパク質と同様に RNA 結合タンパク質である可能性がある。しかし、long form がコードするアミノ酸配列の C 末端は CIRP ホモログのそれとは異なることが予想された。したがって、long form から翻訳されるタンパク質は、CIRP とは C 末端側の立体構造が異なる可能性がある。CIRP が活性化するためにはメチル化あるいはリン酸化されることが必要となるが、それは CIRP の C 末端で起こると報告がある (8)。そのため、long form から翻訳されるタンパク質は、RNA

には結合するものの、メチル化あるいはリン酸化されずに CIRP としての活性をもたないことを示唆している。したがって、平常時には long form から翻訳されるタンパク質は機能的な CIRP タンパク質のドミナントネガティブとしての役割を果たしていると考えた。つまり、平常時には CIRP の発現は認められるものの、その機能は抑制されている可能性がある。一方、冬眠時のシリアンハムスターにおいて、平常体温時に存在していた複数のスプライシングバリエントは観察されず、CIRP のホモログのみが発現していた。このことから、冬眠時にはドミナントネガティブとして働くアイソフォームの発現が減少するため、機能的な CIRP の活性化は抑制が解除される。つまり、平常時には CIRP タンパク質は存在するものの、機能は抑制されており、冬眠時には CIRP の機能の抑制を解除するという状態が想定できる (図 9)。したがって、選択的スプライシングを用いた CIRP 発現機序は、冬眠時に CIRP タンパク質の発現効率を上昇させるだけでなく、素早く機能を発揮させるために有用なメカニズムであるといえる (図 9)。

本章の重要な結果として、平常体温時と冬眠時におけるスプライシングパターンの変化が、心臓、脳、肺、肝臓及び腎臓という様々な臓器から共通に存在することが明らかとなった。この結果から、選択的スプライシングのメカニズムは多くの臓器に共通のものであると考えられる。選択的スプライシングの調節によって CIRP タンパク質が様々な臓器において保護効果を発揮していると期待できる。

本章では、冬眠動物であるシリアンハムスターにおいて、冬眠時に CIRP 遺伝子の発現の変化が起こることを予想し、CIRP 遺伝子の発現解析を行った。結果として、シリアンハムスターでは平常時及び冬眠時のどちらであっても CIRP mRNA が発現していることが明らかとなった。また、平常時には複数のスプライシングバリエントが発現しており、冬眠時には CIRP mRNA 以外のスプライシ

ングバリエントの発現が減少していた。つまり、平常時から冬眠時には選択的スプライシングの調節が起こり、冬眠時には CIRP mRNA の発現に集約していた。さらに、スプライシングバリエントの配列は、CIRP のドミナントネガティブであることを示唆していることから、冬眠時の発現様式は CIRP タンパク質の発現効率及び機能を高める可能性がある。



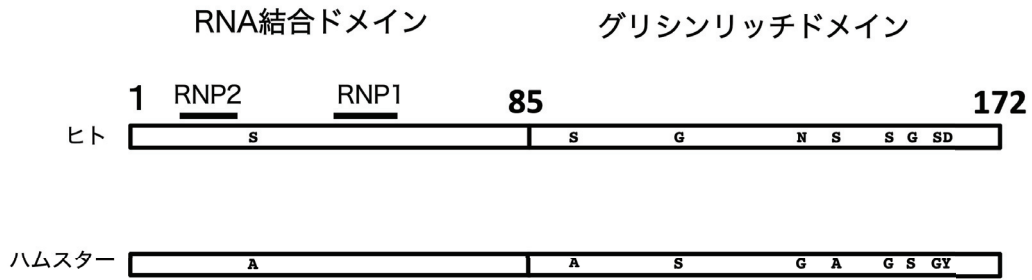


図 8 : Short form がコードするハムスターCIRP ホモログと  
ヒト CIRP タンパク質の機能的ドメインの比較

Short form から同定されたシリアンハムスターの CIRP ホモログの構造を、ヒト CIRP で既に報告のある機能的ドメインと比較した。ヒト CIRP の開始コドンから 1-84 番目のアミノ酸は RNA 結合ドメインである。特に RNP (ribonucleoprotein) 1 及び RNP2 は RNA 結合モチーフとして生物種間で広く保存されている配列である。84 番目以降のアミノ酸領域は、グリシンリッチ領域である。白のバーはアミノ酸配列を示す。ヒト CIRP とハムスターCIRP において、異なるアミノ酸のみを表記し、白抜き部分は相同であることを示す。

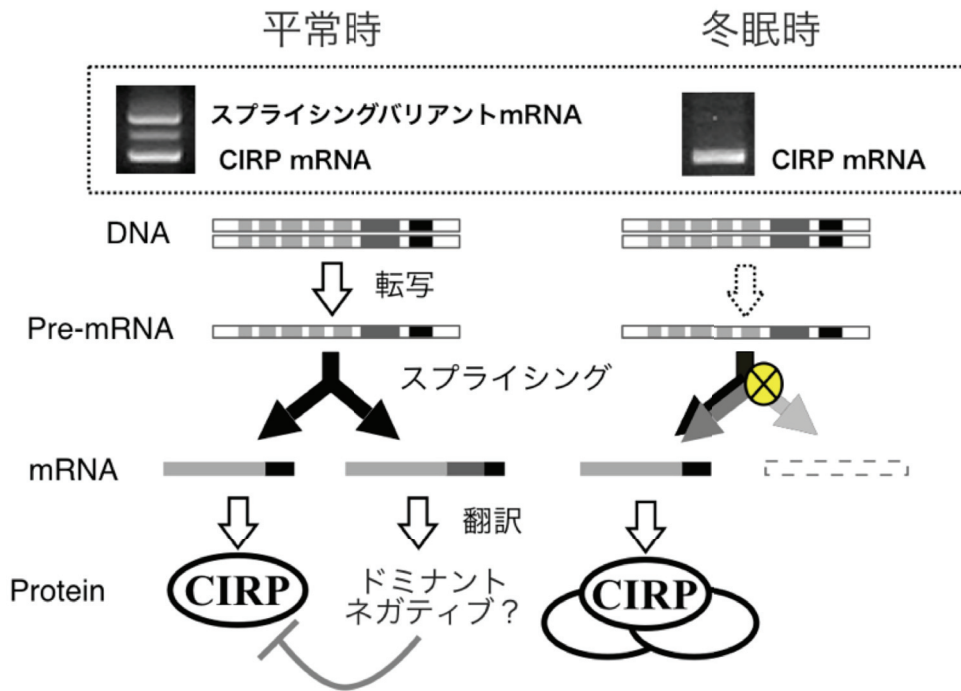


図 9: シリアンハムスターにおける選択的スプライシングの調節を用いた  
CIRP タンパク質発現メカニズム

本研究から考察できる CIRP タンパク質発現機構の仮説を図で示す。平常体温時にはある程度の転写を行うが、複数のスプライシングバリエントに分散することにより CIRP タンパクの合成量や機能が低く調整されている。冬眠時には CIRP タンパク質をコードする mRNA へスプライシングを集約させることによって翻訳や機能を高めている可能性が示唆される。この機構によって、冬眠時のような急激な温度変化に速やかに対応できると考えた。

## 第 2 章

### シリアンハムスターにおける CIRP の選択的スプライシングの変化要因の検討

第 1 章では、自発的な冬眠時に CIRP 遺伝子がスプライシング調節を受けることが明らかとなった。冬眠時に引き起こされる CIRP の選択的スプライシング調節の要因を明らかにし、再現することは、今後その生理機能を検討し、非冬眠動物へ応用していくために重要である。そこで本章では、冬眠時の選択的スプライシングの変化を引き起こす要因を明らかにすることを目的とした。

シリアンハムスターを冬眠させるためには短日条件及び寒冷環境にて飼育することが要求される (4, 19)。さらに、このような環境で飼育することにより冬眠前の準備としてホルモン分泌や遺伝子発現に様々な変化が引き起こされることが報告されている (2, 14, 41, 54)。また、冬眠時に低体温へ導入する際には脳内でアデノシン A1 受容体を介したシグナルが必須である (23, 50)。このような冬眠前の変化及び冬眠導入時のシグナルに着目し、CIRP の選択的スプライシングに影響するのかどうかを明らかにすることとした。そのために、寒冷環境で飼育したハムスターまたはアデノシン A1 受容体アゴニストを脳室内投与し低体温へ誘導したハムスターの CIRP のスプライシング発現を解析した。さらに、麻酔薬を用いて低体温へ誘導することにより、冬眠に関与するアデノシン系のシグナルを介さず、低温そのものによって冬眠様の CIRP の選択的スプライシングを再現できるかどうか検討した。

## 結果

### 寒冷及び短日条件飼育による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

寒冷環境及び短日条件飼育が CIRP の選択的スプライシング調節に影響を与えるのかどうかを解析するため、冬眠していないものの寒冷及び短日環境で長期間飼育した、寒冷及び短日環境飼育群のハムスターを用いて CIRP mRNA の解析を行った。これらのハムスターと同じタイミングで寒冷及び短日条件で飼育したハムスターの 50%以上は冬眠を経験した。冬眠したハムスターは第 1 章において、冬眠個体として解析に使用した。RT-PCR の結果、寒冷及び短日環境で飼育した群のハムスターの脳及び心臓から 3 本のバンドが検出された (図 10)。また、short form と long form の発現量の比を算出し、図 11 にまとめた。寒冷及び短日環境飼育群と平常体温群のハムスターにおいて、有意な差は認められなかった。

### アデノシン A1 受容体アゴニスト (CHA) を用いた人為的な低体温による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

7 匹のハムスターにおいて、CHA の脳室内投与と体表面からの冷却を組み合わせることによって低体温へ誘導した。すべてのハムスターの体温の経時的変化を図 12 に示した。4 匹のハムスターでは、CHA 投与から、体温が 10°C に到達するまでに 350-465 分 (400±42 分 n=4) を要した。実際の自発的な冬眠における低体温到達時間も約 500 分程度である (19, 50) ため、これらのハムスターの体温低下速度は自発的な冬眠と類似していた。さらに、これらのハムスターは自発的な冬眠と同様に、体をまるめた姿勢を呈していた。一方、3 匹のハムスターは、比較的素早い体温低下を示しており、10°C に到達するまでにかかった時間は 165-215 分 (193±20 分 n=3) であった。体温低下に時間を要した

4匹を Slow 群、素早く体温が低下した3匹を Fast 群とした。Slow 群と Fast 群の 10°C到達時間には統計的に有意な差が認められた。RT-PCRにより、体温低下速度にかかわらずすべてのハムスターにおいて、心臓では short form のみが検出された (図 13)。脳においては、実験に供した7匹のハムスターのうち、10°C到達までの時間が有意に長かった Slow 群では、short form への集約が認められた (図 13 slow 群)。一方、Fast 群のハムスターでは、脳においては short form とともに long form の発現が認められた (図 13 fast 群)。一方、CHA を投与後、体温を 37°Cに維持した群では、心臓及び脳において、選択的スプライシングのパターンの変化は引き起こされなかった (図 14, 15)。

また、short form と long form の発現量の比を算出し、平常体温群のハムスターと比較した。心臓においては、CHA を投与し低体温となった Slow 群及び Fast 群で、有意な差が認められた (図 15)。脳において、Slow 群では心臓と同様に、平常体温群と比較し統計学的に有意に変化していた (図 15 slow 群)。一方、CHA を投与し比較的素早く体温が低下した Fast 群では、脳における long form/ short form 比は平常体温群と比較して有意な差は認められなかった (図 15 fast 群)。また、CHA を投与後、体温を 37°Cに維持した群においては心臓、脳ともに、平常体温群と long form/ short form 比に差はなかった。

#### 軽度な低体温による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

CHA を用いた人為的低体温では、脳においてスプライシングの発現に2つのパターンが認められた。そして、異なる発現パターンを示すハムスターは、体温の低下速度にも違いがあり、ゆっくりとした体温低下を示した場合にのみ冬眠様の CIRP の選択的スプライシングが認められた。ゆっくりとした体温低下をした場合には、素早く低下した場合より長い時間、軽度な温度域を経験する。したがって、軽度な低温そのものが CIRP 遺伝子を調節する可能性を検討

した。そこで、アデノシンを介さない方法であり、かつ、外部の温度を調節することにより、動物の体温を操作することができる麻酔薬を用いた低体温誘導法を用いた。28°C付近までの低体温を軽度の低体温、10°Cの体温を極度の低体温と定義し、軽度な低体温によって CIRP が変化するのかどうか調べた。22°Cの室温で飼育していたハムスターを、麻酔と冷却の組み合わせで人為的に低体温へ誘導した。本方法による直腸温の変化を図 16 に示した。人為的に体温を 28°Cで維持した群では、心臓及び脳において、スプライシングバリエーションのうち short form が優勢となる冬眠時のパターンが検出された (図 17 サンプル 3)。また、short form と long form の発現量の比を算出したところ、平常体温群のハムスターと比較し、有意な差が認められた (図 18 サンプル 3)。体温を 28°Cで維持した後、10°Cまで急冷した群においても同様に、冬眠群と類似した、スプライシングが short form へ集約したパターンが検出された (図 17 サンプル 4)。また、平常体温群と比較し、long form/ short form 比についても統計学的に有意に変化していることが認められた (図 18 サンプル 4)。これらのハムスターの直腸温で測定した体温が 28°Cへ到達するまでの時間は、イソフルランを吸入させ始めてから 40-70 分 (51±8 分, n=10) 後であった。

また、ハムスターの体温を 28°Cで維持させず、急速に 10°Cまで低下させた場合に CIRP のスプライシングが変化するかどうかを検討した。ハムスターにイソフルランを吸入させた後速やかに 4°Cに維持した冷蔵庫に移動させたところ、80-185 分 (111±31 分, n=9) 後に体温が 10°Cに達した。この方法では 32-28°Cの温度域に滞在する時間は 8-10 分 (8.9±1.0 分, n=9) だった (図 16)。体温を 10°Cまで急冷した群では、心臓及び脳において、short form への集約は明らかに認められなかった (図 17 サンプル 1)。Long form/ short form 比についても、平常体温群と比較し、統計学的に有意に変化していることは認められなかった (図 18 サンプル 1)。また、長時間の極度の低体温を経験することにより

CIRP の選択的スプライシングが変化するのかどうかを調べた。体温を 10°C まで急冷後 6 時間維持した群では、心臓及び脳において、スプライシングバリエーションの short form への集約は明らかに認められなかった (図 17 サンプル 2)。Long form/ short form 比についても、平常体温時と比較し、有意に変化しているとは認められなかった (図 18 サンプル 2)。

### 精巣の温度及び CIRP mRNA のスプライシング発現

室温 22°C で飼育したシリアンハムスターの精巣の温度を、陰嚢内に設置した体温計測用トランスポンダーにより計測したところ、 $32.2 \pm 3.0^\circ\text{C}$  であった。腹腔内に設置したトランスポンダーにより計測した腹腔内温度は、 $36.6 \pm 0.8^\circ\text{C}$  であった。また、RT-PCR により CIRP mRNA のスプライシング発現を解析したところ、心臓、脳、肺、肝臓及び腎臓の発現とは異なり、精巣では平常体温群においても long form の発現は少なく、short form が多く発現していた (図 19)。また、平常体温群と冬眠群にスプライシングパターンの違いは認められなかった (図 19)。Long form/ short form 比についても、平常体温群と比較し、統計学的に有意に変化していることは認められなかった (図 20)。

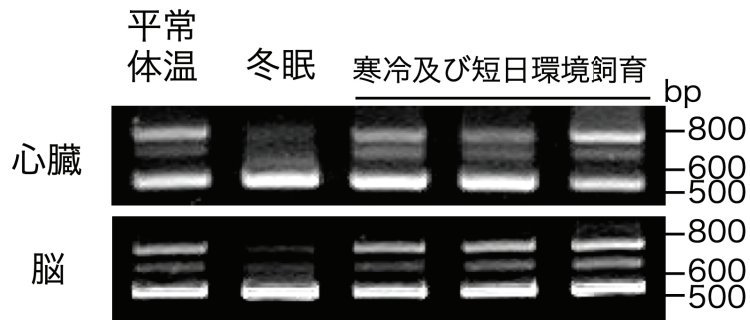


図 10：寒冷及び短日環境飼育群のハムスターにおける CIRP mRNA 発現解析

寒冷及び短日環境飼育群のシリアンハムスターにおける心臓及び脳に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。脳：28 サイクル，心臓：29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹のハムスターにおける結果を示す。比較対象として平常体温群及び冬眠群，それぞれ 1 匹の結果を左に示す。



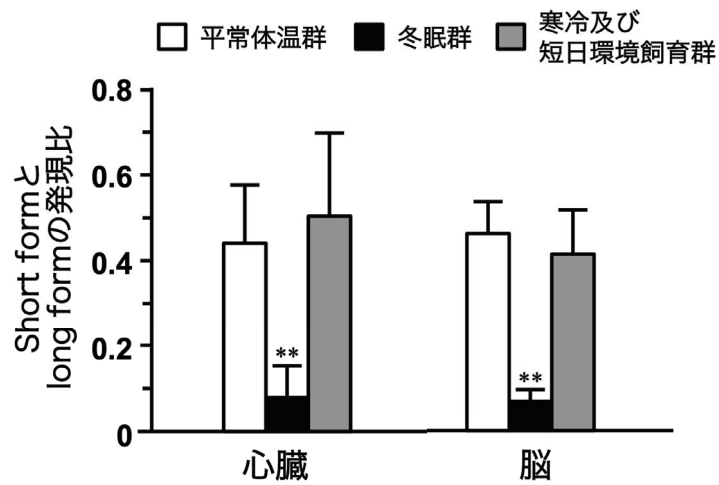


図 11 : 寒冷及び短日環境飼育群におけるスプライシングバリエント発現の変化

各個体の心臓及び脳における short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を算出した。平常体温群 (n=5), 冬眠群 (n=5) 及び寒冷及び短日環境飼育群 (n=7) を平均値±SD で示す。多重比較には Dunnett's 法を用い, 平常体温群とそれぞれの群の値を比較した。\*\*は平常体温群と比較して統計的に有意であったことを表す (P<0.01)。

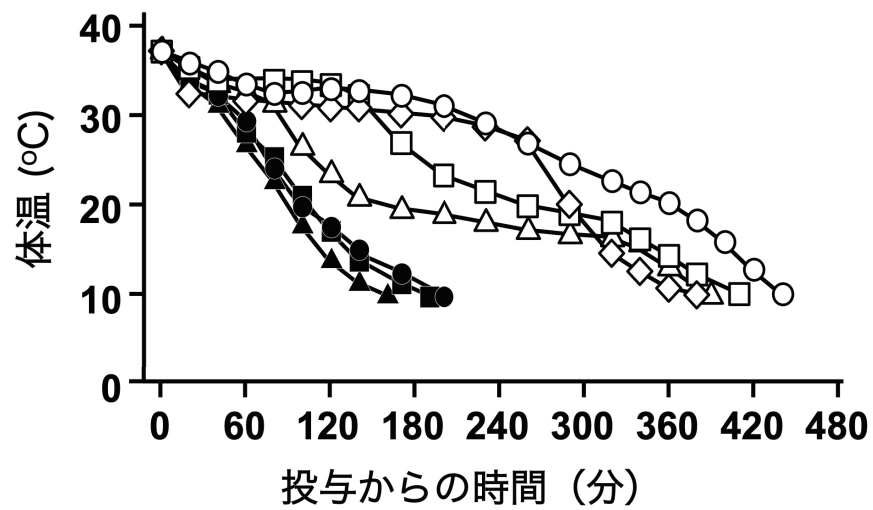


図 12 : CHA を用いて低体温へ誘導したシリアンハムスターにおける  
体温の経時的変化

シリアンハムスターの脳室内にアデノシン A1 受容体アゴニスト (CHA) を投与してからの体温の経時的変化を示す。黒塗りのマークで示した群 (Fast 群) と白抜きのマークで示した群 (Slow 群) の体温が 10°C に到達するまでの時間には有意な差があった。

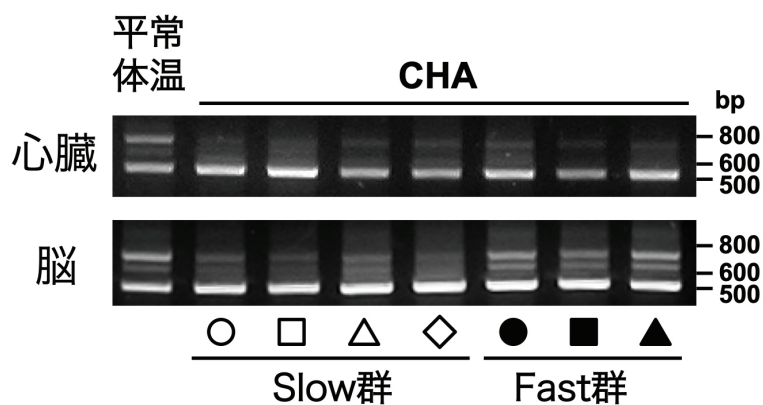


図 13 : CHA を用いて低体温へ誘導したシリアンハムスターにおける  
CIRP mRNA 発現解析

CHA を投与し冷却したシリアンハムスターにおける心臓及び脳に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。脳 : 28 サイクル, 心臓 : 29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカの bp を示す。比較として平常体温時及び冬眠時の PCR 像を示す。Slow 群は 10°C 到達までの時間が有意に長かった群, また, Fast 群は 10°C 到達までの時間が短かった群である。PCR サンプル下のマークは, 図 12 において体温低下を示した個体と同一である。比較対象として平常体温群の PCR 像を示す。

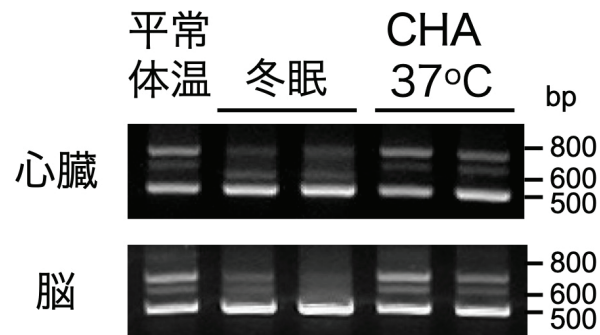


図 14 : CHA 投与後体温を 37°C に維持した群における CIRP mRNA 発現解析

CHA 投与後，体温を 37°C で 4 時間維持したシリアンハムスターにおける，心臓及び脳に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。

脳：28 サイクル，心臓：29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 2 匹のハムスターにおける結果を示す。比較対象として平常体温群及び冬眠群の結果を左に示す。

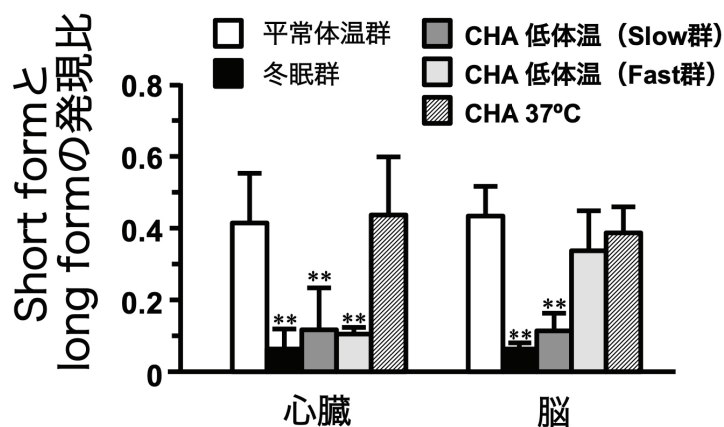


図 15 : CHA 投与による CIRP スプライシングバリエーション発現の変化

各個体の心臓及び脳における short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を算出した。平常体温群 (n=5) と、冬眠群 (n=5), Slow 群 (n=4), Fast 群 (n=3) 及び CHA を投与後、体温を 37°C に維持した群 (n=4) を平均値 ± SD で示す。多重比較には Dunnett's 法を用い、平常体温群とそれぞれの群の値を比較した。\*\*は平常体温群と比較して統計的に有意であったことを表す (P < 0.01)。

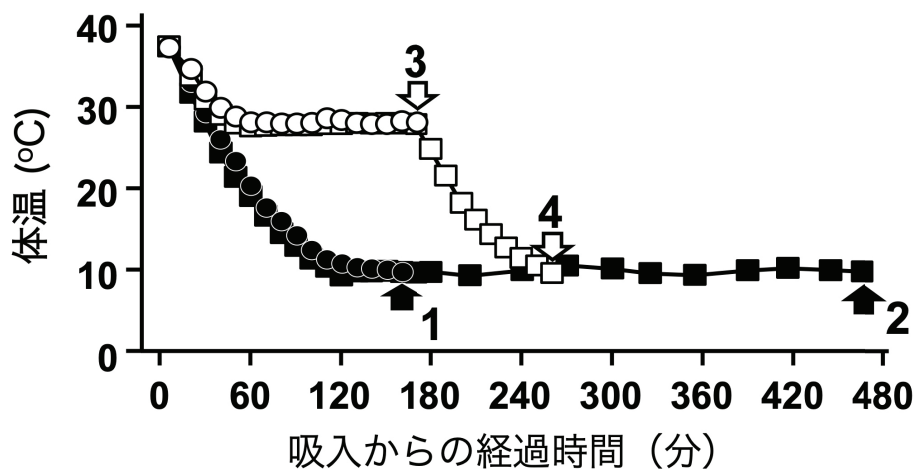


図 16 : イソフルランを用いて低体温へ誘導したシリアンハムスターにおける  
体温の経時的変化

シリアンハムスターにイソフルランを吸入させ冷却した場合の体温の経時的変化を示す。体温を 28°C で維持した群の 1 例を○、体温を 28°C で維持した後、10°C まで急冷した群の 1 例を□でマークしたグラフで示す。また、体温を 10°C まで急冷した群の 1 例を●、体温を 10°C まで急冷後 6 時間維持した群の 1 例を■でマークしたグラフで示す。図中の矢印はハムスターの組織を採材したタイミングを示しており、番号は図 17 及び 18 のサンプル番号と一致している。

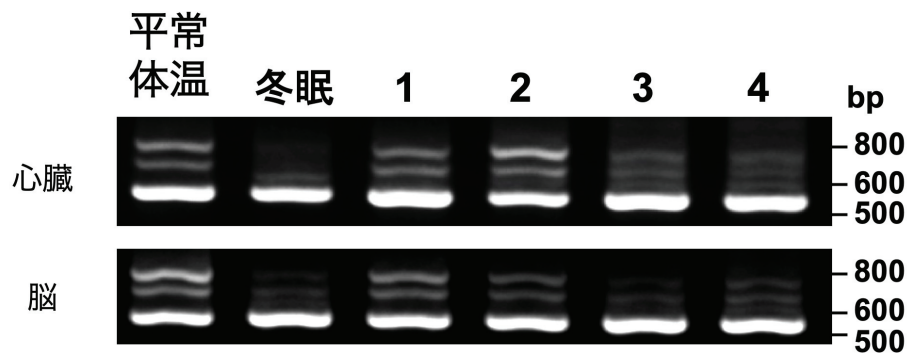


図 17 : イソフルランを用いて低体温へ誘導したシリアンハムスターにおける  
CIRP mRNA 発現解析

イソフルランを用いて人為的に低体温としたシリアンハムスターにおける，心臓及び脳に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。

脳：28 サイクル，心臓：29 サイクルにて RT-PCR を行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。サンプル 1 は，体温を 10°C まで急冷した群，サンプル 2 は体温を 10°C まで急冷後 6 時間維持した群，サンプル 3 は体温を 28°C で維持した群，サンプル 4 は体温を 28°C で維持した後 10°C まで急冷した群から，それぞれ代表の 1 例を示す。比較対象として平常体温群及び冬眠群の結果を左に示す。

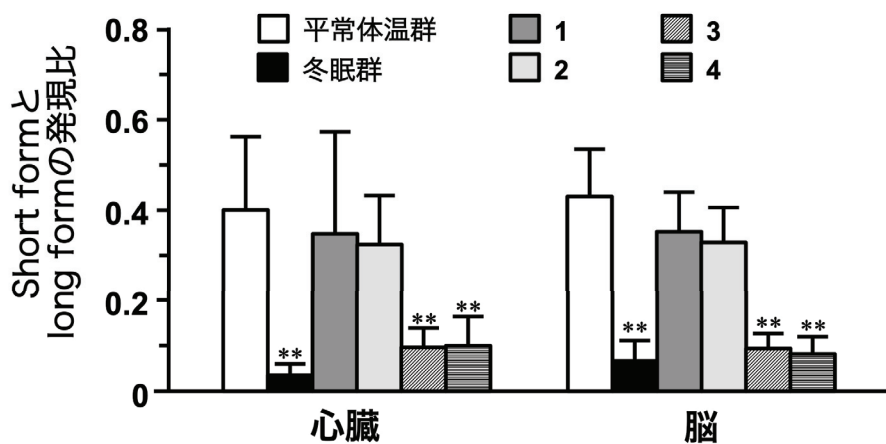


図 18 : イソフルランを用いて低体温へ誘導したシリアンハムスターにおける CIRP スプライシングバリエント発現の変化

各個体の心臓及び脳における short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を算出した。平常体温群 (n=4) と、冬眠群 (n=4)、体温を 10°C まで急冷した群 (サンプル 1 : n=4)、体温を 10°C まで急冷後 6 時間維持した群 (サンプル 2 : n=5)、体温を 28°C で維持した群 (サンプル 3 : n=5) 及び体温を 28°C で維持した後 10°C まで急冷した群 (サンプル 4 : n=5) を平均値 ± SD で示す。多重比較には Dunnett's 法を用い、平常体温群とそれぞれの群の値を比較した。\*\*は平常体温群と比較して統計的に有意であったことを表す (P < 0.01)。



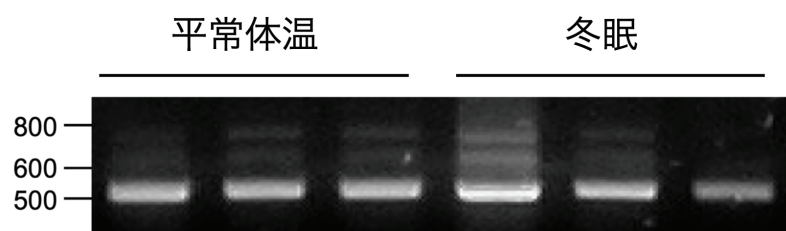


図 19 : 平常体温群及び冬眠群のシリアンハムスターにおける  
精巣の CIRP mRNA 発現解析

平常体温群及び冬眠群のシリアンハムスターにおいて精巣に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。RT-PCR は 30 サイクルにて行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として各群 3 匹のハムスターにおける結果を示す。

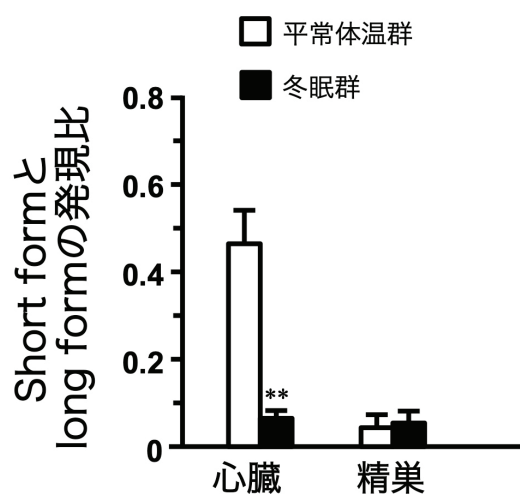


図 20 : 平常体温群と冬眠群のシリアンハムスターにおける精巣の CIRP のスプライシングバリエーション発現の比較

平常体温群と冬眠群のシリアンハムスターにおいて精巣に発現している short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を平均値±SD で示す。白のバーは平常体温群 (n=5), 黒のバーは冬眠群 (n=5) のデータを示す。統計には Student's t 検定を用いた。\*\*は平常体温群と比較して, 冬眠群が統計的に有意であったことを表す (P<0.01)。比較として, 心臓における平常体温時及び冬眠時のデータを示す。

## 考察

第2章では、自発的な冬眠時に認められた CIRP 遺伝子の選択的スプライシングの変化を引き起こす要因を明らかにすることを目的とした。そのため、冬眠動物であるシリアンハムスターを用いて様々な条件下で CIRP のスプライシング発現の解析を行った。その結果、実際に低体温となっていない場合には、寒冷環境及び短日条件への順化やアデノシン A1 受容体を介したシグナルによって、選択的スプライシングの変化は引き起こされないことが明らかとなった。一方、軽度な低体温を十分な時間維持することで、CIRP の選択的スプライシングの発現パターンが冬眠様に変化した。自発的な冬眠において、シリアンハムスターはゆっくりとした体温低下を呈するため、軽度な低体温を数時間経験していると考えられる。このことから、シリアンハムスターの自発的冬眠においても、軽度な低体温により選択的スプライシングが変化する可能性が示唆される。

これまで、冬眠時の低体温に対して耐性を獲得するためには、冬眠前の期間における様々な臓器での遺伝子の発現変化及びそれに伴うリモデリングが必要であると考えられてきた。例えば、冬眠動物では体温低下に先立って、心筋のギャップジャンクションを形成するコネキシン 43 の発現が上昇し、心筋の収縮に関与するトロポニン C の発現が低下している等の報告がある (2, 14, 41)。したがって本研究においても、CIRP の選択的スプライシングの変化が、冬眠時の体温低下に先立って引き起こされている可能性を検討した。しかし、結果として、寒冷及び短日条件での飼育のみで、実際に体温低下の起こっていないハムスターにおいては、冬眠時に観察されたような short form の CIRP mRNA への集約は確認されなかった。同じ期間、同じ環境で飼育したハムスターが冬眠していることから、この環境から与えられる温度刺激及び光刺激は、ある程

度全身のホルモンや神経的な変化をもたらしているはずである。この実験に供した、寒冷及び短日条件で飼育したハムスターが冬眼前の準備を完了していたかどうかについては明らかではないものの、少なくとも部分的には冬眠するための変化を経験していると考えられる。また、CHA またはイソフルランを用いた人為的な方法で体温を低下させた実験では、寒冷環境で飼育していないハムスターを用いたものの、低温の条件によっては CIRP のスプライシングは冬眠様に変化している。このことから、寒冷及び短日条件は CIRP のスプライシングの変化に必須ではないことが示唆された。

シリアンハムスターの自発的な冬眠には、内側視床下部のアデノシン A1 受容体が増加することが重要であると報告がある。体温低下のために、アデノシン A1 受容体は Gi 蛋白共役型受容体として、視床下部において末梢からの求心性シグナルを抑制し、熱産生機構を抑制する (50)。この知見は、自発的な冬眠を行っているハムスターやジリスの脳内にアデノシン A1 受容体のアンタゴニストを投与すると自発的な体温低下が中断するという実験によって証明されている (23, 50)。このように、自発的な冬眠の低体温への導入にはアデノシン系の賦活化が重要であることから、本研究においても CIRP の選択的スプライシングの変化にアデノシンによる影響があると予想した。そこで、アデノシン A1 受容体を特異的に活性化する用量の CHA を脳室内投与し、シリアンハムスターを冬眠様の低体温へ誘導する方法 (31) を用いて CIRP 遺伝子の解析を行った。心臓においては CHA を投与し低体温となった場合には、予想と一致して CIRP のスプライシングは変化した。そこで、もしアデノシン系の賦活化そのものが影響するとすれば、低体温に誘導することなく、37°C に維持した場合でも CIRP のスプライシングが変化するかと予想した。しかし、CHA を投与後に 37°C に維持した場合には CIRP のスプライシング変化は認められなかった。つまり、低体温となった場合には CIRP のスプライシングは変化するものの、ア

デノシン A1 受容体シグナルの中枢での活性化のみでは選択的スプライシングの変化は引き起こされることが明らかとなった。

CHA を脳室内に投与し低体温となったハムスターの脳において、体温低下が有意に早いハムスターでは、CIRP のスプライシングは冬眠様の変化を起こさなかった。興味深いことに、マウスの海馬スライス標本を用いた研究において、33°C 付近の低温下では CIRP mRNA の発現が増加する一方、17°C 付近では発現が増加しないという報告がある (52)。このことから、体温低下速度の違いが選択的スプライシングに影響を及ぼしている可能性があると考えた。体温低下が早い場合、軽度な低温域での滞在時間は短く、体温低下が遅い場合には軽度な低温域での滞在時間は長い。つまり、軽度な温度域での滞在時間によって選択的スプライシングの変化の有無が決定している可能性がある。

体温低下速度が早かったハムスターでは、脳と心臓から異なるスプライシングパターンが検出された。このことは、脳と心臓の温度が厳密には異なったためであると考えられる。素早く体温を低下させたハムスターは自発的な冬眠時のような丸まった姿勢を呈しておらず、伸び切った体勢であった。本実験における脳及び心臓の温度は明らかではないものの、ハムスターが丸まった姿勢を呈していたことは、頭部が体の中心に包まれているため、脳の温度が比較的緩やかに変化していくことを示唆している。心臓は常に体の中心にあるため、体温が急速に落ちた場合にも脳ほどに急速な温度低下を経験していないのではないかと予想している。これらのことから、ハムスターの脳においてスプライシングが変化しなかったのは、スプライシング変化のために重要な温度域を素早く通り過ぎてしまっているからではないかと考えた。したがって、CHA を用いた実験では、心臓と脳で異なる結果が得られたものの、選択的スプライシングの発現が変化する要因は、脳と心臓において同様であり、軽度な低体温である可能性が高いと考えられる。

そこで、軽度な低温それ自体がスプライシングを変化させる可能性を検証した。吸入麻酔薬であるイソフルランを用いて、体温調節中枢を麻酔させる方法により外部からハムスターの体を冷却し、体温を 28°C で 2 時間維持した。この方法により、軽度な温度域を十分に経験したハムスターを作出した。スプライシングを解析したところ、short form に対して long form が明らかに減少する冬眠様の選択的スプライシングのパターンに変化していた。この発現パターンは、体温が 10°C まで低下した場合にも維持された。また、イソフルランを用いた方法であっても、軽度な温度域を素早く通り過ぎるように極度の低体温まで急冷した場合には、維持時間を延長したとしても、心臓及び脳での CIRP のスプライシングが変化しなかった。したがって、イソフルランを用いた低体温誘導によって、スプライシング変化に対する軽度な温度域の重要性が強く示唆された。CHA を用いた低体温誘導法では素早く体温が低下した場合には、心臓においてスプライシングが変化した。CHA を用いた低体温誘導法では体温が 32°C 付近にまで低下してから冷蔵庫に移し、外部から冷却している。そのため、28°C 付近を通過するためには約 60 分程度を要した。一方、イソフルランによる低体温誘導法では麻酔直後から冷蔵庫にて冷却を行っている。そのため、28°C へ到達するためにかかった時間は 30 分未満であった。したがって、CHA を用いる方法とイソフルランを用いる方法では、軽度な温度域での滞在時間に違いがあったためにスプライシングパターンにも違いが見出されたと考えられる。

自発的な冬眠において、頭を体の内側に包み込むように体を丸めた姿勢を取り、ゆっくりと体温を低下させていく様子が観察される (19, 31)。したがって、脳を含めた主要な臓器は急激に冷やされていないと考えられる。本実験において、軽度な低体温により変化した選択的スプライシングは、極度の低体温へ誘導した後にも冬眠様に変化したままであった。このことから、自発的な冬

眠においても、軽度な低体温を長時間経験することにより、その間に CIRP の選択的スプライシングを変化させ、その後の極度の低体温時に起こる障害に備えている可能性がある。

軽度な温度で CIRP 遺伝子の選択的スプライシングが変化するのであれば、平常時から低温にさらされている精巣においては、冬眠時でなくともスプライシングパターンが冬眠時と同様である可能性がある。マウスでの報告 (46) と同様に、シリアンハムスターの精巣の温度は、平常時から腹腔内よりも低温に維持されていた。このように低温条件下にある精巣における CIRP 遺伝子の発現を調べたところ、第 1 章で解析を行った脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓とは異なり、平常時から冬眠様のスプライシングパターンを示していることが明らかとなった。同一個体であっても臓器によってスプライシングのパターンが異なっていたことから、冬眠様の CIRP の選択的スプライシングの調節にとって、軽度な低温そのものが重要な要因であることを示している。

さらに、ヒトやマウスの精巣では CIRP タンパク質が様々な RNA の安定性を高める機能を発揮し、精子形成に寄与している (34, 59)。停留精巣や精巣静脈瘤等の疾患では精巣温度が 33°C 付近よりも上昇する。これらの疾患で精子形成に異常をきたすのは、CIRP 遺伝子の発現が低下するためであると理解されている (34)。シリアンハムスターにおいても精巣温度は低く保たれており、平常時から CIRP タンパク質が精巣において機能している可能性は十分に考えられる。つまり、CIRP の選択的スプライシングのパターンが冬眠様であることが、CIRP が機能するために重要である可能性が示唆された。常に低温である精巣において、選択的スプライシングの調節機構が存在するのかどうかは大変興味深い。特に、停留精巣や精巣静脈瘤のような疾患において、本研究で検出された long form の発現が高まっているならば、long form の発現や機能を抑制することが、精巣における疾患の新たな治療法に繋がる可能性がある。

第2章では、全ての実験において、軽度の低温という条件下ではCIRPの選択的スプライシングが冬眠様であることを示した。したがって、CIRPの選択的スプライシングを冬眠様に変化させる主な要因は軽度な低温であると結論づけた。シリアンハムスターは、自発的な冬眠時において、冬眠導入時のゆっくりとした体温低下の間に軽度な低体温を長時間経験し、CIRPの発現様式を変化させていると考えられる。



### 第3章

#### 非冬眠動物における CIRP の冬眠様選択的スプライシングの誘導

本研究の最終的な目標は、冬眠動物のもつ低温耐性を冬眠しない動物も含めた哺乳動物全般に付与し、低体温の利点を活用することである。第2章では、冬眠動物であるシリアンハムスターを用いて、自発的な冬眠とは独立した方法であっても、軽度な低体温を維持することによって、冬眠様 CIRP の選択的スプライシングを引き起こすことができた。この知見は、冬眠しない動物においても冬眠動物と同様の CIRP 遺伝子発現を誘導できる可能性を示唆している。非冬眠動物においても CIRP の選択的スプライシングを調節するメカニズムが存在するならば、CIRP の機能により期待される低温耐性の効果を、非冬眠動物に付与できる可能性がある。そこで第3章では、冬眠しない動物としてマウス及びラットを用い、CIRP の選択的スプライシングのメカニズムが冬眠動物固有のものなのか、非冬眠動物であっても存在するものなのかどうかを明らかにすることを目的とした。

シリアンハムスターにおける選択的スプライシング調節の特徴は、平常体温時に複数のスプライシングバリエントが存在すること、また、それらの複数のスプライシングバリエントが、軽度な低体温によって、CIRP をコードするひとつの mRNA に集約することである。そこで、まずは非冬眠動物において、複数のスプライシングバリエントが平常時に発現しているのかどうか検討した。続いて、非冬眠動物においても軽度な低体温によって選択的スプライシングの変化が引き起こされるのかどうかを検討した。

## 結果

### 平常体温群のマウスにおける CIRP mRNA 解析

平常体温群のマウスの脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び精巣において、CIRP 遺伝子発現の検索を RT-PCR 法により行った。脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓からは 1 組のプライマーから約 500 bp, 700 bp, 800 bp の 3 つのサイズの PCR 産物が増幅された (図 21)。シリアンハムスターを用いた実験と同様に、約 500 bp の産物を short form, 約 800 bp の産物を long form とした。また、精巣からは約 500 bp の short form が検出され、他の 2 つのサイズの PCR 産物は short form と比較して明らかに薄い像として検出された (図 21)。

心臓から増幅された PCR 産物を用いて、シーケンス解析により塩基配列を解読した。結果として、short form の配列は、データベースに報告のあるマウスの CIRP mRNA (NM\_007705.3) と完全に一致していた (図 22)。また、long form の配列は、データベースに報告のある転写バリエーション (XM\_006513165.1) と一致していた。予想される ORF は、short form と ORF の開始点から 502 bp までは完全に一致していた。一方、3' 末端側の配列は異なっていた。Long form の配列は、short form の最後のエキソンの 5' 末端側にストップコドンを含む 217 bp の塩基配列が挿入されたものであった (図 22)。

### マウスにおける軽度な低体温による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

つづいて、ハムスターで CIRP の選択的スプライシングを変化させた軽度な低体温がマウスにおいても CIRP 遺伝子を調節する可能性を検討した。生存のために重要な臓器として、脳と心臓に絞って解析を行った。平常体温を呈していたマウスを、麻酔と冷却の組み合わせで体温を 28°C へ誘導し、1 時間維持した。

RT-PCR の結果、体温を 28°C で維持した群では、心臓及び脳において、スプライシングバリエーションが short form へ集約した、冬眠群と類似のパターンが検出された (図 23)。

また、マウスの体温を軽度な低温域に滞在させず、急速に 15°C まで低下させた場合には CIRP のスプライシングに影響を与えるかどうかを検討した。マウスにイソフルランを吸入させた後、速やかに 4°C に維持した冷蔵庫に移動させた。この方法により、32-28°C の温度域に滞在する時間は 5-7 分だった。67-72 分 (69 ± 2 分, n=3) 後にマウスの深部体温が 15°C に達した。CIRP のスプライシングパターンを解析したところ、体温を 15°C まで急冷した群では、心臓及び脳において、short form への集約は明らかに認められなかった (図 24)。

さらに、イソフルランを吸入後、体温を 37°C に維持した群では、心臓及び脳において、選択的スプライシングのパターンの変化は引き起こされなかった (図 25)

また、脳及び心臓において、short form と long form の発現量の比を算出し、平常体温群のハムスターと比較したところ、体温を 28°C で維持した群では有意な差が認められた (図 26)。一方、体温を 15°C まで急冷した群及び体温を 37°C に維持した群では平常体温群と比較し、統計学的に有意に変化していることは認められなかった (図 26)。

### マウスにおける寒冷環境での飼育による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

体表面からの寒冷刺激により CIRP の選択的スプライシング調節が変化するかどうかを検討した。そのため 4°C の環境で 1 週間飼育した寒冷環境飼育群のマウスを作出し CIRP mRNA の解析を行った。RT-PCR の結果、マウスの脳及び心臓から 3 本のバンドが検出された (図 27)。また、short form と long form の発

現量の比を算出した。寒冷環境飼育群と平常体温群のマウスにおいて、有意な差は認められなかった（図 28）。

### 平常体温群のラットにおける CIRP mRNA 解析

平常体温群のラットの脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び精巣において、CIRP 遺伝子発現の検索を RT-PCR 法により行った。心臓、肺、肝臓及び腎臓からは 1 組のプライマーから約 500 bp, 700 bp, 800 bp の 3 つのサイズの PCR 産物が増幅された（図 29）。シリアンハムスターを用いた実験と同様に、約 500 bp の産物を short form, 約 800 bp の産物を long form とした。また、精巣からは約 500 bp の short form が検出され、他の 2 つのサイズの PCR 産物は short form と比較して明らかに薄い像として検出された（図 29）。さらに、脳からは、約 1.1kbp の PCR 産物が検出された。また、脳において約 500 bp の short form は十分に検出されたものの、約 700 bp 及び約 800 bp の PCR 産物は short form と比較して明らかに薄い像として検出された（図 29）

### ラットにおける軽度な低体温による CIRP mRNA のスプライシング発現への影響

つづいて、ハムスター及びマウスで CIRP の選択的スプライシングを変化させた軽度な低体温がラットにおいても CIRP 遺伝子を調節する可能性を検討した。22°C で飼育していたラットを、麻酔と冷却の組み合わせで人為的に 28°C の低体温で 1 時間維持した。RT-PCR の結果、体温を 28°C で維持した群では、心臓及び脳において、スプライシングバリエーションが short form へ集約した、冬眠時と類似のパターンが検出された（図 30）。

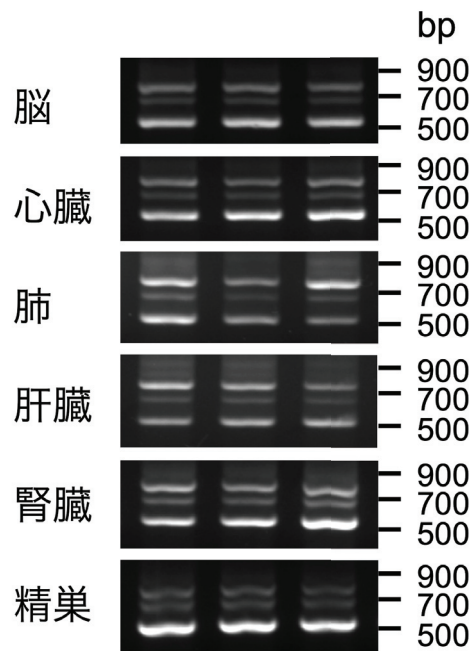


図 21：平常体温群のマウスにおける CIRP mRNA 発現解析

平常体温群のマウスにおいて脳，心臓，肺，肝臓，腎臓及び精巣に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。約 500 bp の産物を short form, 約 800 bp の産物を long form とした。代表として 3 匹のマウスにおける結果を示す。

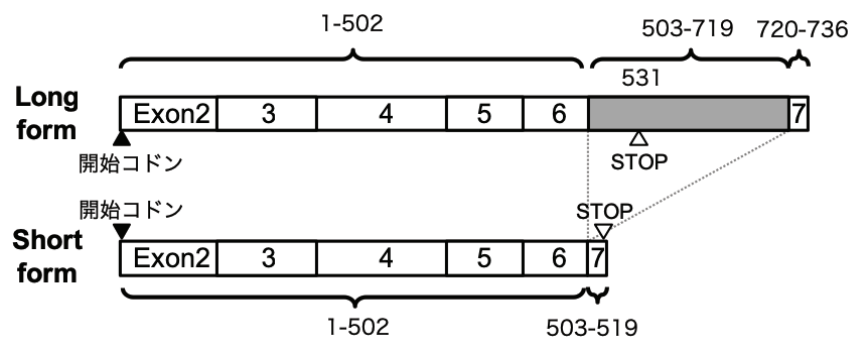


図 22 : マウスにおける short form 及び long form のエクソン構造

Short form 及び long form のエクソン構造を模式図で示す。▲は開始コドン，△は終止コドンを示す。数字は開始コドンからの塩基数を示す。グレーの四角で示した部分が，long form のうち short form と異なる配列である。

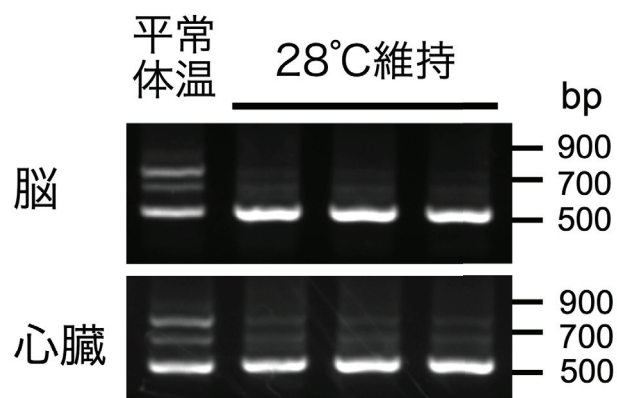


図 23 : 体温を 28°C で維持した群のマウスにおける CIRP mRNA 発現

体温を 28°C で維持したマウスにおいて脳及び心臓に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹マウスにおける結果を示す。左に比較対象として平常体温群の PCR 像を示す。

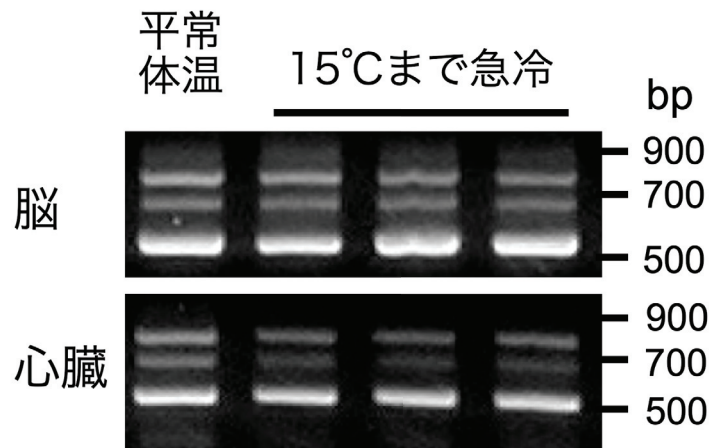


図 24 : 体温を 15°Cまで急冷した群のマウスにおける CIRP mRNA 発現解析

体温を 15°Cまで急冷した群のマウスにおいて脳及び心臓に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹の結果を示す。左に比較対象として平常体温群の PCR 像を示す。



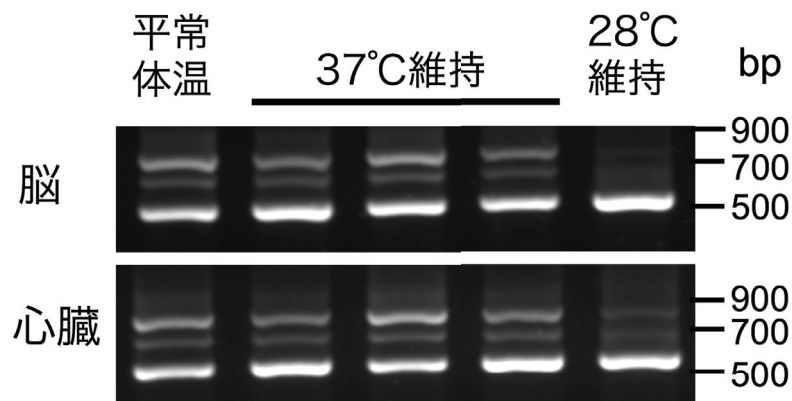


図 25 : イソフルランを吸入後, 体温を 37°C に維持した群のマウスにおける  
CIRP mRNA 発現

イソフルランを吸入後, 体温を 37°C に維持したマウスにおける脳及び心臓に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹の結果を示す。比較対象として平常体温群と体温を 28°C で維持した群の PCR 像を示す。

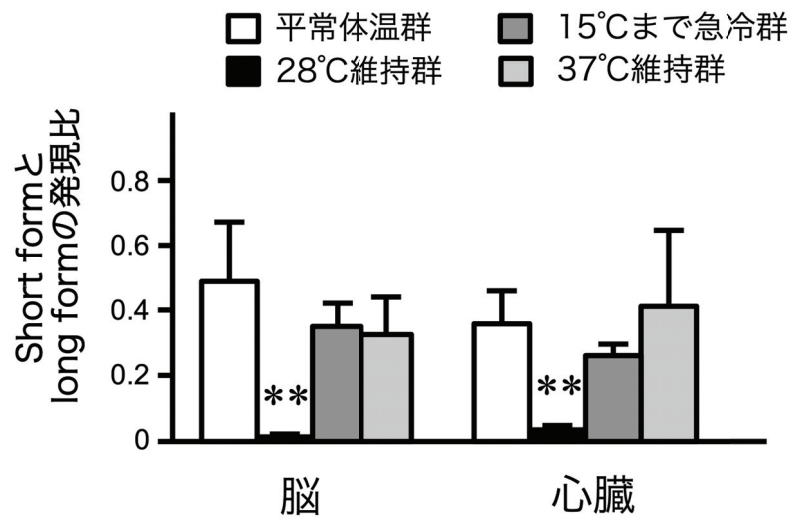


図 26 : マウスにおけるイソフルラン麻酔による  
CIRP スプライシングバリエーションの変化

各個体の脳及び心臓における short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を算出した。平常体温群 (n=5), 体温を 28°C で維持した群 (n=4), 体温を 15°C まで急冷した群 (n=3) 及びイソフルランを吸入後, 体温を 37°C に維持した群 (n=4) を平均値 ± SD で示す。多重比較には Dunnett's 法を用い, 平常体温群とそれぞれの群の値を比較した。\*\*は平常体温群と比較して統計的に有意であったことを表す (P < 0.01)。

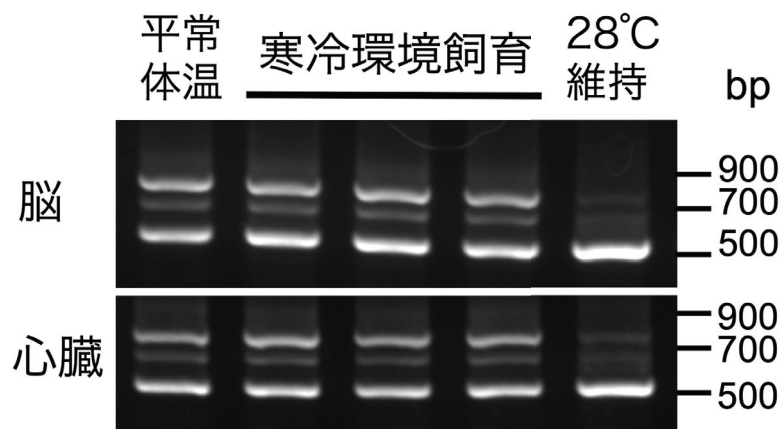


図 27：寒冷環境飼育群のマウスにおける CIRP mRNA 発現解析

寒冷環境飼育群のマウスにおいて、脳及び心臓に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹の結果を示す。比較対象として平常体温群と体温を 28°C で維持した群の PCR 像を示す。

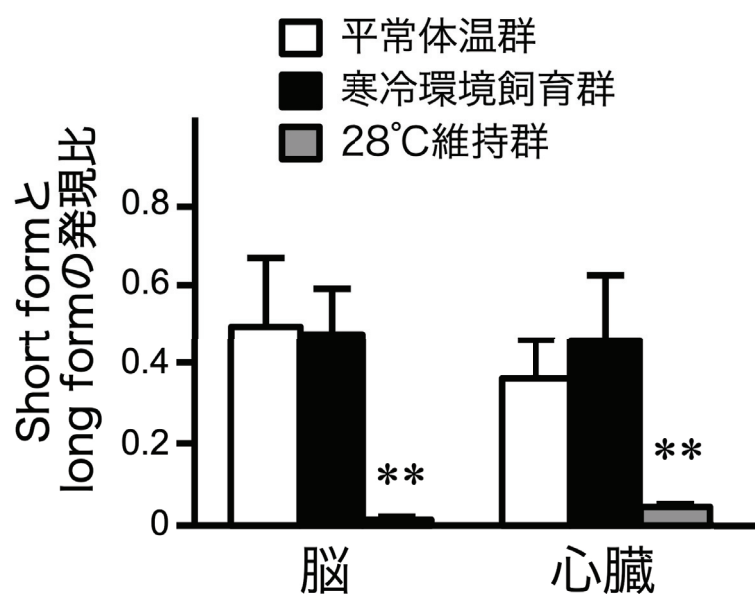


図 28 : 寒冷環境飼育群のマウスにおける  
CIRP スプライシングバリエーションの変化

各個体の脳及び心臓における short form と long form の発現量の比 (long form/short form) を算出した。平常体温群 (n=5), 低体温群 (n=4) 及び寒冷環境飼育群 (n=5) を平均値± SD で示す。多重比較には Dunnett's 法を用い, 平常体温群とそれぞれの群の値を比較した。\*\*は平常体温群と比較して統計的に有意であったことを表す (P<0.01)。

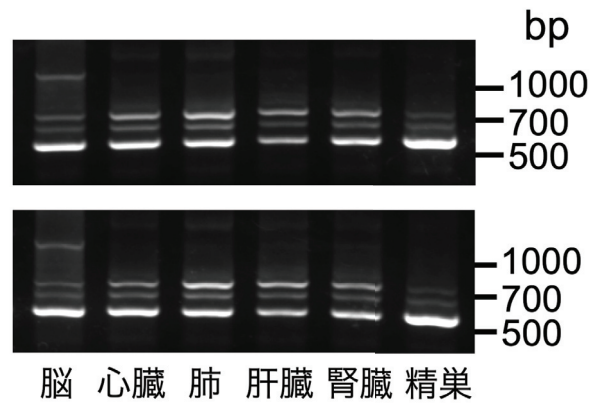


図 29：平常体温群のラットにおける CIRP mRNA 発現

平常体温群のラットの脳，心臓，肺，肝臓，腎臓及び精巣に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。2 匹のラットにおける結果を示す。写真横の数値はマーカーの bp を示す。約 500 bp の産物を short form，約 800 bp の産物を long form とした。

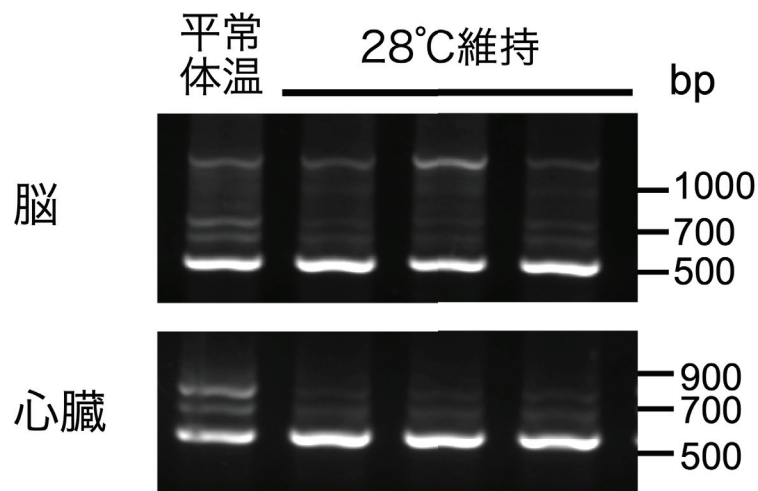


図 30 : 体温を 28°C で維持した群のラットにおける CIRP mRNA 発現解析

体温を 28°C で維持したラットにおいて、脳及び心臓に発現していた CIRP mRNA の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。PCR は全て 30 サイクルで行った。写真横の数値はマーカーの bp を示す。代表として 3 匹の結果を示す。比較対象として平常体温群の PCR 像を示す。

## 考察

第3章では、冬眠動物であるシリアンハムスターにおいて存在した CIRP 遺伝子の選択的スプライシングの調節メカニズムが非冬眠動物にも存在するのかどうか検討した。その結果、非冬眠動物であるマウス及びラットにおいても平常体温時には機能的な CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエントが存在することが明らかとなった。また、ハムスターと同様に、軽度な低体温が、CIRP の選択的スプライシングのパターンを変化させることも示された。

本研究において、マウス及びラットにおいても、平常時から CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエントの発現が認められた。このことから、マウス及びラットでも、冬眠動物と同様に、選択的スプライシングを切り替えるのみで機能的な CIRP mRNA の発現の効率を増やすことができる可能性がある。マウスにおける long form の配列は、データベースのものと一致していたものの未だ機能については報告されていないものであった。配列から予想される long form のコードするタンパク質の構造は、機能的な CIRP の C 末端の 5 つのアミノ酸が、異なる 9 つのアミノ酸配列に置き換わった形であった。この配列の構造は、第1章で明らかとなったシリアンハムスターの long form の構造と同様である。したがって、平常体温時のシリアンハムスターと同様に、非冬眠動物であるマウス及びラットにおいても、long form がコードするタンパク質は機能的な CIRP タンパク質のドミナントネガティブとしての機能を持つ可能性がある。つまり、選択的スプライシングを切り替えることにより、CIRP タンパク質の発現効率を上昇させるだけでなく、機能を十分に発揮させるメカニズムがマウス及びラットにおいても備わっていることが示唆された。

第3章で最も重要な結果は、冬眠しないマウス及びラットにおいても、人為的に低体温に誘導することによって、冬眠様のスプライシングパターンへの変

化を再現できたことである。人為的な低体温誘導は麻酔薬を用いて行われた。しかし、麻酔薬を吸入させた後に 37°C で維持した場合にはスプライシングは変化しなかったため、スプライシングパターンの変化は麻酔薬の影響ではなく、体温の低下に依存するものといえる。また、マウスにおいては、急激に体温を低下させた場合には CIRP のスプライシングパターンは変化しなかったため、軽度な低体温が選択的スプライシングを変化させるために重要であることを強く支持する結果となった。選択的スプライシングが軽度な温度域で引き起こされることは、シリアンハムスターと同様である。したがって、低温を刺激として CIRP を調節するメカニズムが冬眠動物固有のものではなく、非冬眠動物にも共通して存在している可能性があることが示唆された。この考えと一致して、マウスでは餌の不足と環境温度の低下によって、1 日以内で体温を 10°C ほど低下させる日内休眠をいう行動をとることが知られている (3)。また、ラットにおいても餌の不足により、1°C 以内ではあるものの深部体温を低下させる機構が備わっている (42)。したがって、全身で体温低下する状況は、冬眠のような極度の低体温でなくても存在する。そのため、冬眠しない動物においても、低温による CIRP の発現機構が保存されている可能性がある。

体表面からの低温刺激が選択的スプライシングを変化させるかどうかを検討するため、マウスを寒冷環境下にて 1 週間飼育した。1 週間の低温環境飼育という条件は、マウスにおいて褐色脂肪組織の過形成に代表される寒冷への順化が認められる条件である (47)。つまり、この条件では、体表面からの低温刺激は十分に全身に影響を及ぼしていると考えられる。しかし寒冷環境飼育のみでは、選択的スプライシングのパターンに有意な変化はなかった。したがって、CIRP のスプライシングパターンは体表面から低温刺激ではなく、組織そのものが低温となる必要があると明らかとなった。実際に、組織の温度が深部体温より低い精巣では、平常体温時においても long form が薄く、short form が強く発現し



ていた。そのため、軽度な低温そのものが選択的スプライシングに影響するという仮説を支持する結果となった。

ラットの脳では、long form は、平常体温時にも発現が少ないものの、軽度な低体温により long form の発現はより減少していることも明らかとなった。したがって、脳においても心臓と同様の選択的スプライシングの調節による CIRP 遺伝子制御機構は存在すると考えられる。一方、ラットの脳からはシリアンハムスターやマウスからは検出されなかった約 1.1kbp のバンドが検出された。また、軽度な低温においても約 1.1kbp のバンドは変化をしなかった。今後、約 1.1kbp の PCR 産物の配列を解析する必要があるものの、ラットの脳に関しては、シリアンハムスターやマウスとは異なるメカニズムが存在する可能性がある。

第 1 章では冬眠動物において、CIRP 遺伝子の発現調節が、低体温に陥る際に素早く CIRP タンパク質の機能を発揮するために重要であると考察してきた。一方、本章において、冬眠しない動物であるマウス及びラットにおいても同様の選択的スプライシング発現調節が存在することが認められた。このことから、これらの動物では冬眠時のような低体温障害から保護する目的とは異なる目的のために選択的スプライシング調節を機能させている可能性がある。CIRP をノックアウトした細胞ではコントロールの細胞と比較し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や Wnt, アポトーシス等のシグナル経路の発現に明らかな違いが見出されている。このことから、CIRP は恒常的に機能しているといえる(51)。これらのシグナル伝達系は細胞の刺激に対して素早く対応し、生体の恒常性を保っている。つまり、冬眠時のような全身が低体温に陥るという状況下でなくとも、細胞レベルでは、選択的スプライシングを用いた CIRP の発現上昇機構が、生体の恒常性を維持するために機能している可能性がある。また、CIRP タンパク質の発現の上昇には、低温の他にも低酸素、紫外線等の刺激が引き金となる(45, 55, 64, 65)。そのため、低体温以外の要因によって、CIRP の選択的スプラ

インシグ調節が引き起こされ、恒常性を保つために機能する可能性もある。今後、CIRPの選択的スプライシングの低温以外の要因と効果についても明らかにしていくことが期待される。

本研究では、シリアンハムスターは、CIRPのスプライシング制御により低体温に対する耐性を獲得できている可能性があると考えている。本章の研究によって、冬眠しない動物であるマウスとラットにおいてもCIRPの選択的スプライシングを冬眠様に制御できることが明らかとなった。したがって、非冬眠動物であっても低体温に対する耐性を獲得できる可能性が示唆された。冬眠しない動物を強制的に低体温とすることにより、特に致命的な障害は、心臓における不整脈である(13)。そこで、冬眠様のCIRP発現様式のまま低体温に導入することにより、心臓に起こる低体温時の障害を回避することが期待できる。今後、非冬眠動物の低体温時の障害に対してどのような効果を発揮するのかどうか詳細に解析していく必要がある。

## 総合考察

本研究は、冬眠動物のもつ低体温耐性を非冬眠動物に付与することで低体温による弊害を回避することを最終的な目標としている。そこで、低温下で発現を上昇させ、さらに細胞の保護機能を有する低温ショックタンパク質 CIRP に着目した。第 1 章では冬眠動物であるシリアンハムスターにおける冬眠時の CIRP の選択的スプライシングの変化を明らかとした。第 2 章ではその選択的スプライシング調節の変化を引き起こす要因が軽度の低体温であることについて解明した。第 3 章では非冬眠動物において冬眠様の CIRP の選択的スプライシングの調節を再現することに成功した。このことにより、冬眠様の CIRP の選択的スプライシングの調節を介して、非冬眠動物にも低体温耐性を付与できる可能性が示唆された (図 31)。

植物においては、温度により選択的スプライシングが変化するといいくつかの報告があり (37, 53), このメカニズムが哺乳動物にも共通している可能性がある。さらに、哺乳動物の培養細胞を用いた研究によって、低温培養により CIRP の発現の上昇とともに、選択的スプライシングに重要な因子である SRSF5 の発現が上昇すると報告されている (15)。したがって、生体内でも SRSF5 の変化を介して CIRP の選択的スプライシングが変化した可能性があると考えている。つまり、軽度な低温により選択的スプライシングが変化するという発見は、哺乳動物における選択的スプライシングを介した温度によるタンパク質発現の調節機構を生体内で見出した重要な知見である。

これまで、低温下での CIRP タンパク質の上昇には、転写レベルの活性化が主要な要因であると考えられてきた。マウスの線維芽細胞を用いた研究において、軽度な低温は選択的プロモーターを変化させることにより遺伝子の転写を活性化していると報告がある (1)。また、転写因子 Sp1 が 32°C の温度条件下

において活性化し、CIRP mRNA の上昇に寄与している (49)。一方、転写後調節による機能的な CIRP の上昇についても報告がある。例として、低温はマウスの線維芽細胞においては CIRP の pre-mRNA からのスプライシング効率を上昇させる (17)。本研究で明らかとした選択的スプライシングの変化は、哺乳動物の CIRP の発現メカニズムにおいて新規の発見となった。

冬眠動物を用いて、冬眠時の変化について明らかにすることを目的としたいくつかの研究が行われている。その中のひとつに、シマリスを用いた Hibernation protein (HP) の研究がある (24)。シマリスでは、冬眠時にのみ脳内で HP が上昇し、脳神経系で重要な役割を担っているのではないかと報告されている。これらの研究に用いられているシマリスや、ジリスなどの冬眠動物は季節性の冬眠を行う。したがって、それらの動物を用いて得られた変化には季節性の因子が関与している可能性を考慮する必要がある。実際に、HP の発現には年周期リズム (circannual rhythm) が関与している (24)。一方、本研究で実験に用いたシリアンハムスターは、実験室内で低温及び明暗環境を暗期が長くなるように調節することにより 1 年を通して自発的な冬眠を行うことができる (4, 31)。このことから、シリアンハムスターの行う冬眠には、季節性はないと認められている (22)。本研究においても、第 1 章では、季節を問わずにシリアンハムスターの冬眠を作出し、サンプリングを行っている。そして、どの季節でサンプリングした個体でも、同様の CIRP のスプライシングパターンが検出された。さらに、第 2 章及び第 3 章では、どの季節で行った実験においても、人為的にスプライシングを冬眠様に変化させることができた。このことから、CIRP の選択的スプライシング調節には季節性の因子は必要がないことが明らかである。したがって、冬眠時の低体温耐性に寄与する分子に着目した多くの研究の中でも、本研究で明らかとなった選択的スプライシングの調節による効果は、非冬眠動物に適用できる可能性が高いといえる。

低温時には、様々な酵素活性が低下するため、多くのタンパク質の発現が低下する。CIRPはRNA結合タンパク質として、RNAの安定性を高めることで必要なタンパク質が発現できるように機能している(32, 59, 63-65)。このように、冬眠動物では、低温時の影響を緩和するためにCIRPが機能していると考えられる。また、冬眠時には心拍動は規則正しい洞律動を保つものの、心拍数は著しく低下する。さらに冬眠から回復する場合にも、非常に短い時間で体温及び心拍数が回復する。このように、冬眠時の体温変化に伴って、低酸素ストレス及び酸化ストレスのリスクが非常に高いものの、冬眠動物には虚血再灌流障害が起こらないことが知られている(38)。そこで、CIRPには低温ストレス以外にも機能を発揮できる可能性があるかと推察している。なぜなら、CIRPは、低酸素ストレスによっても誘導され(55)、さらに、CIRPは過酸化水素に誘導されたアポトーシスにも保護作用を示すからである(26, 27)。このように、冬眠動物はCIRPの発現を制御することにより様々なリスクから細胞死を防ぎ、冬眠を行っているのではないかと考えられる。

ヒトの医療の分野において脳外傷など重篤な傷害の治療として、低体温療法がある(10, 20, 43, 48, 57, 58)。しかし、低体温による心臓循環器系の障害という副作用がこの治療の適用範囲を狭めている(30)。第2章及び第3章では、動物を急冷することによりスプライシングの変化を起こさずに低体温へと誘導した。今後、これらの動物が、選択的スプライシングによる保護効果を得られずに、低温による障害を起こしている可能性について、明らかにすることが必要である。本研究において、冬眠様のCIRPの選択的スプライシングパターンは、医療現場で広く使用されるイソフルラン麻酔を用いて、人為的に再現することができた。しかし、本研究で使用した28℃という温度、及びシリアンハムスターでは2時間、マウス及びラットにおいては1時間という時間条件設定が、CIRPタンパク質の機能及び量までに影響を与えるのかどうかはまだ明らかと

なっていない。CIRP タンパク質の発現解析及び機能の解析を行い、低温耐性にまで影響を及ぼす、温度及び時間を明らかにすることが今後の課題である。

本研究では、これまで報告されてきた CIRP の細胞保護作用が、選択的スプライシングの調節によって、効率よく発揮されていることを前提としている。このスプライシングメカニズムによって、冬眠動物は冬眠時に CIRP の細胞保護作用を発揮し、低体温障害を回避していると考えている。CIRP タンパク質は N 末端側に存在する RNA 結合領域にて他の RNA に結合することで、RNA の安定性を高め、翻訳を調節する (32, 59, 63-65)。これらの機能により、細胞の低温ストレスへの反応を調節していると考えられている。一方、本研究において発見された long form からタンパク質が翻訳されるとすれば、C 末端側の配列に違いのある CIRP アイソフォームが産生する。CIRP の C 末端には活性に重要なドメインが存在する (8) ことから、このアイソフォームは CIRP のドミナントネガティブとしての機能が予想される。つまり、long form が発現する条件下では CIRP の機能が阻害されると考えられる。平常時から CIRP タンパク質を発現させておくことは、低温時に CIRP が必要となった場合にすぐに利用できるという利点がある。一方、平常時には必要のない CIRP が働き、平常体温の生体内では悪影響を及ぼす可能性もある。そのため、平常時に long form が CIRP の機能を抑制することは、CIRP の必要のない状況では機能させずに、発現を維持するため、低温時に素早く CIRP を機能させるメカニズムとして有用である。今後、既に確立されている CIRP の機能を指標に、long form の存在する条件と、long form の存在しない条件での CIRP の活性を解析することで、CIRP が選択的スプライシングの調節により、低体温に対して保護機能を発揮するという仮説を明らかにしていく必要がある。本研究の選択的スプライシングに関わる知見を糸口として、冬眠動物のもつ画期的な CIRP の発現調節機構とその機能を非冬眠動物に応用し、低体温時のみならず様々な障害に対して耐性が付与される

ことが期待できる。

## シリアンハムスターにおける冬眠様CIRP発現機構

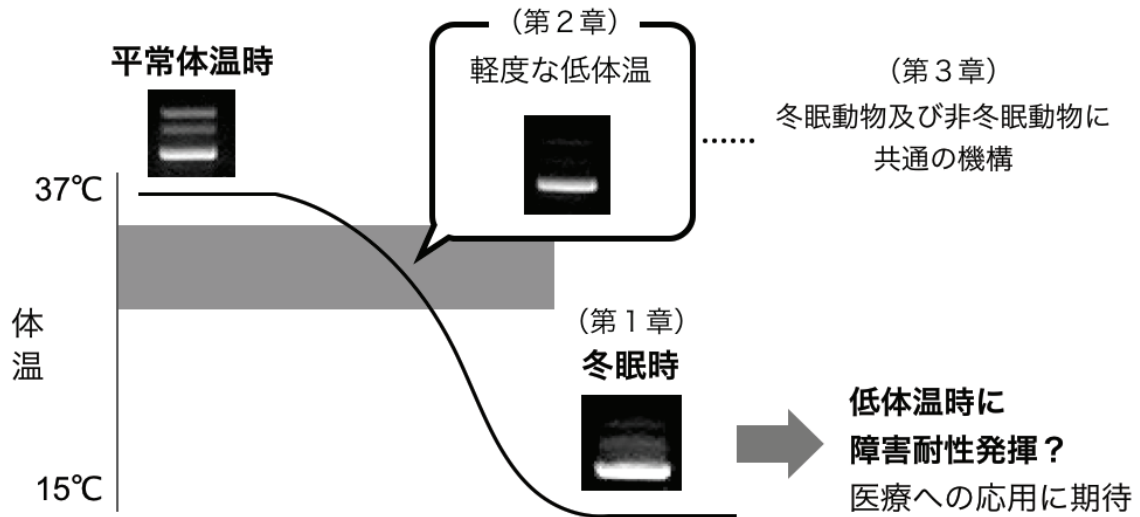


図 31：本研究で明らかとなった CIRP 選択的スプライシングの変化と

今後の展望

第1章及び第2章において明らかとしたシリアンハムスターにおける CIRP 遺伝子発現様式を図に示す。第3章では、マウス及びラットにおいて、冬眠動物のシリアンハムスターと同様の発現様式を再現することができた。この結果は、非冬眠動物においても、冬眠動物のような耐性を発揮するために役立つと期待できる。



## 結論

第1章では、冬眠動物であるシリアンハムスターにおいて、低体温耐性に関与する可能性のある CIRP の遺伝子発現を解析した。平常体温時には機能的な CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエントを発現させておき、冬眠時には CIRP mRNA のみの発現に集約するという選択的スプライシング発現の制御が存在することが明らかとなった。

第2章では、シリアンハムスターの冬眠時に引き起こされる CIRP の選択的スプライシング調節を引き起こす要因について明らかにした。シリアンハムスターにおいては、軽度な低体温で維持されることにより冬眠様の選択的スプライシングのパターンへ移行することが示唆された。CIRP のスプライシング制御は冬眠のメカニズムとは独立したものであることも明らかとなった。

第3章では、冬眠しない動物である ddY 系マウスと SD 系ラットにおいても、冬眠様の CIRP 遺伝子制御が再現できるかどうか検討した。マウス及びラットにおいては冬眠動物と同様に平常体温時には機能的な CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエントを発現させておき、軽度な低体温により CIRP mRNA のみの発現に集約するという選択的スプライシング発現の制御を再現することができた。

本研究で明らかとした冬眠様の CIRP の選択的スプライシング制御は、シリアンハムスターにおいて冬眠時の低体温耐性に関与すると考えている。冬眠しない動物にも冬眠時の低体温耐性を付与することができれば、低体温療法や移植臓器の保存などへの医療応用が期待される。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、岐阜大学応用生物科学部教授 志水泰武博士、同准教授 椎名貴彦博士に深く感謝を申し上げます。

本論文の草稿をご校閲くださいました、岐阜大学応用生物科学部教授 海野年弘博士、帯広畜産大学畜産学部准教授 室井喜景博士、岩手大学農学部教授 木崎景一郎博士、東京農工大学グローバル研究院教授 永岡謙太郎博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご指導とご協力を頂きました、岐阜大学名誉教授 武脇義博士に深く感謝致します。

また、研究に際して多大なご協力をくださいました岐阜大学獣医生理学教室の学生の皆様に心より御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Al-Fageeh, M. B. and Smales, C. M. (2013). Alternative promoters regulate Cold inducible RNA- binding (CIRP) gene expression and enhance transgene expression in mammalian cells. *Mol. Biotechnol.* 54, 238~249
- 2) Brauch, K. M., Dhruv, N. D., Hanse, E. A. and Andrews, M. T. (2005). Digital transcriptome analysis indicates adaptive mechanisms in the heart of a hibernating mammal. *Physiol. Genomics.* 23, 227~234.
- 3) Breukelen, F. V. and Martin, S. L. (2015). The Hibernation continuum: Physiological and molecular aspects of metabolic plasticity in mammals physiology. *Physiology.* 30, 273~281.
- 4) Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M. and Yamaguchi, Y. (2016). Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. *R. Soc. Open. Sci.* 3, 160002.
- 5) Chip, S., Zelmer, A., Ogunshola, O. O., Felderhoff-Mueser, U., Nitsch, C., Bührer, C. and Wellmann, S. (2011). The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol. Dis.* 43, 388~396.
- 6) Danno, S., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Xue, J. H., Itoh, K., Matsuda, T. and Fujita, J. (1997). Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA- binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 804~807.
- 7) Danno, S., Itoh, K., Matsuda, T. and Fujita, J. (2000). Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. *Am. J. Pathol.* 156, 1685~1692.

- 8) De Leeuw, F., Zhang, T., Wauquier, C., Huez, G., Kruys, V. and Gueydan, C. (2007). The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp. Cell Res.* 313, 4130~4144.
- 9) Dresios, J., Aschrafi, A., Owens, G. C., Vanderklish, P. W., Edelman, G. M. and Mauro, V. P. (2005). Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 1865~1870.
- 10) El-Wahsh, M. (2007). Liver graft preservation: an overview. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 6, 12~16.
- 11) Fedorov, V. B., Goropashnaya, A. V., Tøien, Ø., Stewart, N. C., Gracey, A. Y., Chang, C. L., Qin, S. Z., Pertea, G., Quackenbush, J., Showe, L. C., Showe, M. K., Boyer, B. B. and Barnes, B. M. (2009). Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol. Genomics.* 37, 108~118.
- 12) Fedorov, V. B., Goropashnaya, A. V., Tøien, O., Stewart, N. C., Chang, C., Wang, H., Yan, J., Showe, L. C., Showe, M. K. and Barnes, B. M. (2011). Modulation of gene expression in heart and liver of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *BMC Genomics.* 12, 171.
- 13) Fedorov, V. V., Glukhov, A. V., Sudharshan, S., Egorov, Y., Rosenshtraukh, L. V. and Efimov, I. R. (2008). Electrophysiological mechanisms of antiarrhythmic protection during hypothermia in winter hibernating versus nonhibernating mammals. *Heart Rhythm* 5, 1587~1596.
- 14) Fedorov, V. V., Li, L., Glukhov, A., Shishkina, I., Aliev, R. R., Mikheeva, T., Nikolski, V. P., Rosenshtraukh, L. V. and Efimov, I. R. (2005). Hibernator *Citellus*

- undulates maintains safe cardiac conduction and is protected against tachyarrhythmias during extreme hypothermia: possible role of Cx43 and Cx45 up-regulation. *Heart Rhythm* 2, 966~975.
- 15) Fujita, T., Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Liu, Y., Itoh, K., Sakurai, T., Kojima, T., Kandori, S., Nishiyama, H., Fukumoto, M., Fukumoto, M., Shibasaki, K. and Fujita, J. (2017). TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. *Sci. Rep.* 23, 2295.
- 16) Gluckman, P. D., Wyatt, J. S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A. D., Ferriero, D. M., Polin, R. A., Robertson, C. M., Thoresen, M., Whitelaw, A. and Gunn, A. J. (2005). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet.* 365, 663~670.
- 17) Gotic, I., Omidi, S., Fleury-Olela, F., Molina, N., Naef, F. and Schibler, U. (2016). Temperature regulates splicing efficiency of the cold-inducible RNA-binding protein gene *Cirbp*. *Genes. Dev.* 30, 2005~2017.
- 18) Gualerzi, C.O., Giuliadori, A.M. and Pon, C.L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* 331, 527~539.
- 19) Horwitz, B. A., Chau, S. M., Hamilton, J. S., Song, C., Gorgone, J., Saenz, M., Horowitz, J. M. and Chen, C. Y. (2013). Temporal relationships of blood pressure, heart rate, baroreflex function, and body temperature change over a hibernation bout in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R759~R768.
- 20) Ishikawa, A., Mori, A., Kabei, N., Yoshitake, A., Suzuki, Y., Katori, N., Morisaki, H., Yozu, R. and Takeda, J. (2009). Epidural cooling minimizes spinal cord injury after aortic cross-clamping through induction of nitric oxide synthase. *Anesthesiology* 111, 818~825.

- 21) Ivanov, K.P. (2000). Physiological blocking of the mechanisms of cold death: theoretical and experimental considerations. *J. Therm. Biol.* 25, 467~479.
- 22) Jansky, L., Haddad, G., Kahlerova, Z. and Nedoma, J. (1984). Effect of external factors on hibernation of golden-hamsters. *J. Comp. Physiol.* 154, 427~433.
- 23) Jinka, T. R., Tøien, Ø. and Drew, K. L. (2011). Season primes the brain in an arctic hibernator to facilitate entrance into torpor mediated by adenosine A(1) receptors. *J. Neurosci.* 31, 10752~10758.
- 24) Kondo, N., Sekijima, T., Kondo, J., Takamatsu, N., Tohya, K. and Ohtsu, T. (2006). Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* 125, 161~172.
- 25) Lee, H. N., Ahn, S. M. and Jang, H. H. (2015). Cold-inducible RNA-binding protein, CIRP, inhibits DNA damage-induced apoptosis by regulating p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 916~921.
- 26) Li, S., Zhang, Z., Xue, J., Liu, A. and Zhang, H. (2012). Cold-inducible RNA binding protein inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in rat cortical neurons. *Brain Res.* 1441, 47~52.
- 27) Liu, J., Xue, J., Zhang, H., Li, S., Liu, Y., Xu, D., Zou, M., Zhang, Z. and Diao, J. (2015). Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res.* 1597, 189~195.
- 28) Liu, Y., Hu, W., Murakawa, Y., Yin, J., Wang, G., Landthaler, M. and Yan, J. (2013). Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. *Sci Rep.* 3, 2054.
- 29) Leonart, M.E. (2010). A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1805, 43~52.
- 30) Mattu, A., Brady, W.J. and Perron, A.D. (2002). Electrocardiographic manifestations of hypothermia. *Am. J. Emerg. Med.* 20, 314~326.

- 31) Miyazawa, S., Shimizu, Y., Shiina, T., Hirayama, H., Morita, H. and Takewaki, T. (2008). Central A1-receptor activation associated with onset of torpor protects the heart against low temperature in the Syrian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R991~R996.
- 32) Morf, J., Rey, G., Schneider, K., Stratmann, M., Fujita, J., Naef, F., Schibler, U. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science* 338, 379~383.
- 33) Morin, L. P. and Wood, P.I. (2001). *A Stereotaxic Atlas of the Golden Hamster Brain*. Academic Press, California.
- 34) Nishiyama, H., Danno, S., Kaneko, Y., Itoh, K., Yokoi, H., Fukumoto, M., Okuno, H., Millán, J. L., Matsuda, T., Yoshida, O. and Fujita, J. (1998). Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am. J. Pathol.* 152, 289~296.
- 35) Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Itoh, K. and Danno, S. (1997). Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* 204, 115~120.
- 36) Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O. and Fujita, J. (1997). A glycerinerich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J. Cell. Biol.* 137, 899~908.
- 37) Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G. C., Immink, R. G. and Schmid, M. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature* 503, 414~417.
- 38) Quinones, Q. J., Ma, Q., Zhang, Z., Barnes, B. M., Podgoreanu, M. V. (2014). Organ protective mechanisms common to extremes of physiology: a window through hibernation biology. *Integr. Comp. Biol.* 54, 497~515.

- 39) Ruf, T. and Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 891~926.
- 40) Saito, K., Fukuda, N., Matsumoto, T., Iribe, Y., Tsunemi, A., Kazama, T., Yoshida-Noro, C. and Hayashi, N. (2010). Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein. *Brain. Res.* 1358, 20~29.
- 41) Saitongdee, P., Milner, P., Becker, D. L., Knight, G. E. and Burnstock, G. (2000). Increased connexin43 gap junction protein in hamster cardiomyocytes during cold acclimatization and hibernation. *Cardiovasc. Res.* 47, 108~115.
- 42) Sakurada, S., Shido, O., Sugimoto, N., Hiratsuka, Y., Yoda, T. and Kanosue, K. (2000). Autonomic and behavioural thermoregulation in starved rats. *J. Physiol.* 526, 417~424.
- 43) Schefold, J. C., Storm, C., Joerres, A. and Hasper, D. (2008). Mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest and the risk of bleeding in patients with acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 132, 387~391.
- 44) Shankaran, S., Laptook, A. R., Tyson, J. E., Ehrenkranz, R. A., Bann, C. M., Das, A., Higgins, R. D., Bara, R., Pappas, A., McDonald, S. A., Goldberg, R. N. and Walsh, M. C. (2012). Evolution of encephalopathy during whole body hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Pediatr.* 160, 567~572.
- 45) Sheikh, M. S., Carrier, F., Papathanasiou, M. A., Hollander, M. C., Zhan, Q., Yu, K. and Fornace, A. J. Jr. (1997). Identification of several human homologs of hamster DNA damage-inducible transcripts. Cloning and characterization of a novel UV-inducible cDNA that codes for a putative RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 272, 26720~26726.
- 46) Shetty, G., Porter, K. L., Zhou, W., Shao, S. H., Weng, C. C. and Meistrich, M. L.



- (2011). Androgen suppression-induced stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice acts by elevating the testicular temperature. *Endocrinology* 152, 3504~3514.
- 47) Shimizu, Y., Nikami, H., Tsukazaki, K., Machado, U. F., Yano, H., Seino, Y. and Saito, M. (1993). Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am. J. Physiol.* 264, E890~895.
- 48) Stefanutti, G., Pierro, A., Parkinson, J.E., Smith, V.V. and Eaton, S. (2008). Moderate hypothermia as a rescue therapy against intestinal ischemia and reperfusion injury in the rat. *Crit. Care Med.* 36, 1564~1572.
- 49) Sumitomo, Y., Higashitsuji, H., Higashitsuji, H., Liu, Y., Fujita, T., Sakurai, T., Candeias, M. M., Itoh, K., Chiba, T. and Fujita, J. (2012). Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to induction of cold-inducible RNA-binding protein (cirp) expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 12, 72.
- 50) Tamura, Y., Shintani, M., Nakamura, A., Monden, M. and Shiomi, H. (2005). Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res.* 1045, 88~96.
- 51) Tang, C., Wang, Y., Lan, D., Feng, X., Zhu, X., Nie, P. and Yue, H. (2015). Analysis of gene expression profiles reveals the regulatory network of cold-inducible RNA-binding protein mediating the growth of BHK-21 cells. *Cell Biol. Int.* 39, 678~689.
- 52) Tong, G., Endersfelder, S., Rosenthal, L.M., Wollersheim, S., Sauer, I.M., Bühner, C., Berger, F. and Schmitt, K.R. (2013). Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res.* 1504, 74~84.

- 53) Verhage, L., Severing, E. I., Bucher, J., Lammers, M., Busscher-Lange, J., Bonnema, G., Rodenburg, N., Proveniers, M. C., Angenent, G. C. and Immink, R. G. (2017). Splicing-related genes are alternatively spliced upon changes in ambient temperatures in plants. *PLoS One* 12, e0172950
- 54) Weitten, M., Robin, J. P., Oudart, H., Pévet, P. and Habbold, C. (2013). Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters. *Horm. Behav.* 64, 611~617.
- 55) Wellmann, S., Buhner, C., Moderegger, E., Zelmer, A., Kirschner, R., Koehne, P., Fujita, J. and Seeger, K. (2004). Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J. Cell. Sci.* 117, 1785~1794.
- 56) Williams, D. R., Epperson, L. E., Li, W., Hughes, M. A., Taylor, R., Rogers, J., Martin, S.L., Cossins, A. R. and Gracey, A. Y. (2005). Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol. Genomics.* 24, 13~22.
- 57) Willoughby, R. E. Jr., Tieves, K. S., Hoffman, G. M., Ghanayem, N. S., Amlie-Lefond, C. M., Schwabe, M. J., Chusid, M. J. and Rupprecht, C. E. (2005). Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* 352, 2508~2514.
- 58) Wion, D. (2017). Therapeutic dormancy to delay postsurgical glioma recurrence: the past, present and promise of focal hypothermia. *J. Neurooncol.* 133, 447~454.
- 59) Xia, Z., Zheng, X., Zheng, H., Liu, X., Yang, Z. and Wang, X. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis. *FEBS Lett.* 586, 3299~3308.
- 60) Xue, J. H., Nonoguchi, K., Fukumoto, M., Sato, T., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Itoh, K. and Fujita, J. (1999). Effects of ischemia and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the cold stress

- protein CIRP expression in rat neuronal cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1238~1244.
- 61) Yan, J., Barnes, B. M., Kohl, F. and Marr, T. G. (2008). Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol. Genomics* 32, 170~181.
- 62) Zhang, H. T., Xue, J. H., Zhang, Z. W., Kong, H. B., Liu, A. J., Li, S. C. and Xu, D. G. (2015). Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res.* 1622, 474~483.
- 63) Zhang, Y., Wu, Y., Mao, P., Li, F., Han, X., Zhang, Y., Jiang, S., Chen, Y., Huang, J., Liu, D., Zhao, Y., Ma, W. and Songyang, Z. (2016). Cold-inducible RNA-binding protein CIRP/hnRNP A18 regulates telomerase activity in a temperature-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 44, 761~775.
- 64) Zhong, P. and Huang, H. (2017). Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein. *Future Sci. OA* 3, FSO246.
- 65) Zhu, X., Bühner, C. and Wellmann, S. (2016). Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 3839~3859.