

# 年周リズムに支配され脳で冬眠を制御するホルモン

近藤 宣 昭

哺乳類の不思議な適応能力に冬眠がある。冬眠状態では、生体は0℃近い致死的低体温を許容するだけでなく、種々の有害要因から保護されるとの報告がなされている。この能力に強い関心が寄せられ、冬眠を制御する因子が二十世紀初めから探索されてきた。最近、この制御に必須なタンパク質複合体が初めて発見され、冬眠の謎解きに強い期待が寄せられている。ここでは、余り知られていない冬眠現象について概説し、冬眠研究の世界情勢を加味しながらタンパク質発見の経緯と意義について紹介する。本稿を通して、冬眠の概念を再考する必要性と、医学応用への大きな可能性や驚くべき長寿効果についても触れ、ベールに包まれてきた冬眠の真の姿に迫ってみたい。

## はじめに

生体の生存に不可欠である種々の物質の化学的変化は、代謝という言葉で総称される。これは、細胞内でのエネルギー変換やタンパク質の発現、細胞内外のシグナル伝達、細胞膜を介したイオン移動などの生命維持に欠くことのできない様々な機能の原動力である。代謝反応が正常に調節されるには、それに関わるタンパク質が機能する至適温度の維持が重要であり、恒温動物である哺乳類では正常体温の37℃がそれにあたる。通常、体温が30℃以下に低下すると体温調節を司る神経機能が障害され自力での正常体温への復温は困難となり、20℃付近を境として心臓の機能も停止する。これらの変化は低温による代謝機能の低下に由来し、この状態が続けば短時間で凍死する。

ところが、哺乳類であっても冬眠が可能な動物はその時期になると5~6℃にまで体温が低下しても、まるで変温動物のように生存できる。もちろん、この間の代謝機能は生体の活動に見合って調節されており、心臓や脳・神経系などの生命維持に直結する器官の細胞も、機能の速度は著しく低下するが正常に維持され血液の拍出や神経活動がな

されている。哺乳類では致死的である0℃に近い体温で生体が生存できるとの事実は、冬眠動物の細胞膜やタンパク質の機能、エネルギー代謝などの生命維持に必須の要素が、極度の低温でもことごとく障害されないことを示している。つまり、冬眠は、生物が何十億年もの歳月を経て変温性から恒温性へと進化する中で創造された極限状態を生きるための生命システムと考えることができる。

通常の哺乳類が持つ恒温性のシステムは、その最大の利点である高い活動性を常に保証し効率を高める一方で、そこでは起こりえない低い体温に対しては、極めて脆弱な細胞を作り上げる結果となった。冬眠は、この恒温性が必然的に生む低温への脆弱さを克服したシステムとの推測ができる。つまり、冬眠を可能にする機構を解き明かすには、通常の恒温性が持つ最大の弱点を克服するシステムを究明することが不可欠なのである。ここでは、冬眠の分子的理解を目指すため、その基礎となる現象について概説し、筆者が冬眠研究を始める契機となった心臓研究に触れつつ、冬眠を制御するシステムへのアプローチを中心に紹介する。ここから、我々が目指す生体保護システムとしての新たな冬眠の理解に迫ってみたい。

## 1. 冬眠の多様性

冬眠は、数℃まで体温が低下した状態で1日以上生存し、自発的に元の体温に復温できる現象として一般的に定義されている。しかし、“冬眠”も英語の“hibernation”からも、冬の寒さや食物不足を避けて巣に籠もる不活動状

三菱化学生命科学研究所 (〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号)

Mammalian hibernation is circannually controlled by a novel hormone in the brain

Noriaki Kondo (Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Minamiooya 11, Machida, Tokyo 194-8511, Japan)

態を推測はさせるが、体温低下を想像することはできない。この“冬眠”から受ける不明瞭さは、変温性で体温調節機能を持たない両生類や爬虫類が環境温度の低下により体温が低下した状態も冬眠と表現することや、哺乳類のクマなどの体温が下がり下らない不活動状態も冬眠と呼ぶことから理解できるだろう。このように、状態は“結果”を観察して表現したものであるため、往々にして“原因”の究明を誤らせることがある。そこで、以下に幾つかの例を挙げながら冬眠の現象としての多様性について触れておきたい。

哺乳類の中で、冬眠できる動物は7目に分類される(単項目、食虫目、齧歯目、翼手目、有袋目、食肉目、霊長目)<sup>1)</sup>。一概に冬眠といっても、その仕方にはそれぞれ違いがある。最も良く研究に用いられている齧歯目の冬眠動物でも、冬眠が季節性に起こる種(ジリスやシマリス)と環境変化による種(ゴールデンハムスター)が存在する。前者でも、冬季の冬眠期間中に食物を摂取せず、冬眠前に体内に蓄積した脂肪をエネルギー源として生存するタイプ(ジリスなど)と、巣に貯めた食物も定期的に摂取するタイプ(シマリスなど)に分けられる。体温低下の程度にも違いがあり、一般的には0℃以上を維持するが、北極ジリスなどは氷点下まで体温が低下するとの報告もある。さらに、冬眠期間中には、一定期間持続した体温低下の後に必ず短時間の覚醒(37℃の正常体温に復温:中途覚醒と呼ぶ)が定期的にかかるが、この体温低下が持続する期間も異なり、シマリスは1週間ほどで、ジリスでは1カ月にも達することがある。一方、ハムスター類には、体温が15℃以下には下がらず10時間ほどの短い低体温状態を毎日繰り返す種も存在し、日内休眠と呼んで冬眠とは区別している<sup>2)</sup>。食肉目のクマの冬眠は他の小動物とは大きく異なり、体温は30℃以下には下がらないが摂食や排便、排尿もしない不活動状態が6カ月も持続し、その間に出産をする<sup>3)</sup>。

以上のように、冬眠状態は動物種によって大きく異なることが分かる。そうならば、最初に述べた冬眠の定義から外れる1日以下の軽度の体温低下(例えば、日内休眠やクマの冬眠)を冬眠から区別すべきかとの議論が必然的に起こる。しかし、この議論を深めるには、冬眠状態の観察以外に、その原因となる機構の理解を待たねばならない。これは、睡眠と冬眠が類似の現象か、との未決着の議論にも似ている<sup>4,5)</sup>。睡眠中には不活動状態が持続し、その間僅かではあるが体温も低下するからである。何れにせよ、これまで体温低下現象によって覆い隠され曖昧にされてきた冬眠の生理学的、生物学的意義を明らかにするには、冬眠を制御する機構の分子的理解が不可欠なのである。

## 2. 冬眠の生物医学的重要性

冬眠を定義する唯一の生理的指標が体温低下であったため、体温調節の生理学的特性が調べられてきた。冬眠中でも、数℃まで低下した体温は環境温度よりも1~2℃高く保たれているため、恒温性の体温設定閾が37℃より低く設定されていると推測された。外部からの皮膚刺激や、騒音などによる聴覚刺激は発熱反応を起こして体温を上昇させて覚醒する。覚醒する際の体温上昇には、筋肉の震えを必要としない褐色脂肪組織による非震え熱産生(ミトコンドリアでの脱共役タンパク質を介する機構)が重要な働きをするが、これも主に中枢からの交感神経系によって支配されている。これらは傍証的な結果ではあるが、体温設定は新たに低い閾値に調節され、低体温状態でも脳や末梢の神経系、熱産性や血液循環系などの生命維持に不可欠な機構は正常に機能していることが分かる。特に、生命機構を制御する脳の機能には強い興味を抱かれてきたが、冬眠時の極度の低体温下では神経細胞の微弱な電気的変化は検出困難となり、冬眠中の脳や末梢神経系における詳細な生理学的研究は余りなされておらず、生化学的研究もほとんど進んではいない。このような冬眠中の視床下部での体温設定域の変更やそれに伴う細胞の低温耐性は、体温を自在に変化させて代謝を制御するための画期的な機構の存在を推測させるが、未だ明らかにされていない。

冬眠中に起こる常識はずれの低体温下でも低体温症を発症しないことから、脳神経系に限らず末梢の主要器官にも低温耐性が備わっていると考えられる。これを究明できれば、生体が受けた損傷の進行を停止させたり、心臓の外科的治療や移植臓器の保存などに低温を有効に利用できると期待された。そこで、細胞膜脂質の相転移温度を低下させる不飽和脂肪酸の増加や、タンパク質機能の耐寒性を増すような異性体の存在、エネルギー産生の要であるミトコンドリアの機能などが調べられてきたが、いずれも肯定的な結果は得られなかった<sup>6)</sup>。ところが、筆者による心筋細胞の電気生理学的研究から、収縮を制御する細胞内Caイオン濃度の調節に重要な変化が起こっていることが発見され(詳細は後述)、これが細胞レベルでの低温障害を回避する初めての機構として注目されている。

さらに、冬眠中には、低体温だけではなく種々の致死性の病因に対する耐性も増加することが報告されている。冬眠中に摘出された脳のスライス切片は、低酸素や低グルコース状態に耐性を持ち低温ほど耐性が増すことや、冬眠中の生体に致死量の真菌を投与したり発がん物質を作用させても影響がないこと、致死量の放射線照射後の生存時間も大幅に延長されるとの結果が示されている。ヒトの脳傷害の治療などに用いられる低体温療法では、数℃程度の軽度の体温低下でさえ免疫能の低下による感染症などが致命

的な問題となることから、冬眠には、免疫系などの生体の防御や保護を強化する機構が介在すると考えられる。その他にも、冬眠から覚醒する際に観察される30℃を超えた急激な体温上昇から細胞を保護する機構や、冬眠中の長期間の不活動状態からくる筋萎縮を防止する機構の存在も推測されている。

以上のように、冬眠は、生体を健全に維持する機構が強く発現している生理状態と考えることができる。この機構は、低温と加温、虚血、細菌、発がん物質、放射線などの生体に致死的な多様なリスクに対応可能であることから、広範な医学的応用に結びつく。しかし、反面、これを理解するには単に細胞や組織での個別の研究ではなく、それらを生体レベルで制御して多様性を生み出す高次なシステムへのアプローチが不可欠となる。

### 3. 冬眠との最初の接点 “体温低下”

ここまで述べてきたように、冬眠には大きな可能性が秘められているが、その分子的理解は進んでいない。それには、冬眠が体温低下によって定義されてきたため、両者が不可分であることが深く関わっている。つまり、低温は冬眠を研究する際の入り口であり、避けては通れない。このことは、冬眠の研究では低温によって被る分子や細胞、組織の変化は不可避であることを物語っており、冬眠の原因となる機構の究明を難しくしてきた。なぜなら、低温は体内での分子の動きや相互作用、タンパク質の機能や活性などのあらゆる生命機能を大幅に低下させる根本的な要因だからである。低温によって著しく低下する反応速度や機能は、その測定や検出を困難にするし、低温は、ほとんどの場合、高温でのタンパク質変性のような分子を不可逆的に障害することはなく、逆に構造や機能の安定性を増す。このような低温の性質は、実験的アプローチの拠り所となる種々の要素の変化量を低減して解析を困難なものにしてきた。従来の冬眠研究は、この低温との葛藤の中で、低温が生体や細胞に及ぼす影響を調べる歴史をたどってきた。

その結果として、前述したように、低温を相手にして細胞を構成する膜脂質やタンパク質などの素材や、ミトコンドリア、遺伝子発現などの機能の変化を追求したり、生体レベルでは、細胞機能を低温環境に適応させるために増加する体内因子（ホルモンや神経伝達物質）が調べられ探索されてきた<sup>6,7)</sup>。これが成功しなかったのは、低温がタンパク質の機能やエネルギー代謝反応などの速度を減じはするが、それ自体に致命的な不可逆的な変化を起こさないためと考えられる。つまり、精製したタンパク質や、抽出したミトコンドリアなどの細胞内小器官は、10℃以下（冬眠時の生体温度）の温度では、むしろ安定に保存できるので、そのような素材に低温耐性の原因を求めるとは無理がある。ここでの問題は、タンパク質、細胞、器官、生体へと

単純系から複雑系へと向かうに従って、生命維持には、より高度な秩序の維持が求められることにある。低温による分子レベルの機能低下はそれぞれを傷害はしないが、結果的にこの秩序を乱してシステムとしての生命の歯車を狂わせることになる。冬眠動物の体内ではこの問題を解決する機構が働いているはずであり、このことから、低体温で生命を維持する冬眠を理解するには、個々の分子や細胞の問題以上に生体を維持するシステムの究明が重要と考えられる。

### 4. 低温との葛藤：臓器低温保存

冬眠研究から、細胞レベルでの機能変化が初めて見出されたのは、1984年に筆者が発表したシマリスの心筋を用いた電気生理学的・薬理学的研究によってであった<sup>8)</sup>。この研究は、それ以前のウサギ心筋の長期低温保存研究から得た次のようなヒントによって導かれた。

臓器移植のための摘出心臓の長期保存を目指した研究から、低温保存下のウサギ心臓の収縮機能の低下が細胞膜Na, K-ATPaseやCa-ATPaseなどの細胞の生存に必須の酵素類の機能低下ではなく、ミトコンドリアの呼吸機能の低下に起因していることを突き止め、これを防止するのにクレアチンが有効であることを見出した<sup>9)</sup>。クレアチンは、ミトコンドリアで産生されたATPを用いクレアチンキナーゼによってクレアチンリン酸(CrP)に転換されてエネルギーを貯蔵・運搬する物質であり、ATPが不足するとその逆反応によりCrPとADPからATPが作られて生体で利用される(図1)。そのため、低温保存下で過剰に添加したクレアチンは細胞内でCrPの産生を促進してATPを減少させ、不足したATPによりミトコンドリアの活性化とそれに伴うCrPの増加が起こされ、この効果により、エネルギー代謝系が維持されて心筋細胞が保護されたと推

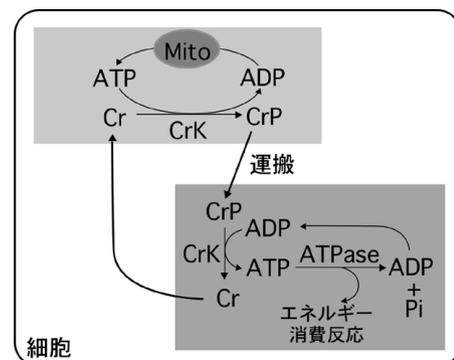


図1 エネルギー代謝とクレアチン

ミトコンドリア (Mito) で産生されたATPを用いて、クレアチンキナーゼ (CrK) はクレアチン (Cr) からCrPを産生する。CrPは、エネルギー貯蔵物質としての役割を担うとともに、細胞内のエネルギー消費部位に運搬されて局在性CrK isozymeによりATPに変換され、ATPaseを介してエネルギー依存性の反応を起こす。

測した。実際、低温保存中にはCrP量が増加し、保存後に再加温するとミトコンドリアの呼吸活性とCrP量の著しい増加が観察され、それに見合って収縮力も維持されたのである。しかし、この方法でも、心臓機能の低下は徐々に進行し、これを防止することはできなかった。

この研究から、二つの重要な示唆を得ることになった。第一はミトコンドリアの機能維持が心筋の保存を律する重要要因であり、第二は心筋細胞が低温下でもある程度の生存能力を維持していることであった。つまり、低温保存が最も困難な心臓でさえ幾らかは低温に耐えることと、ミトコンドリアのようにそれを律する要因が細胞内に存在することが分かったのである。しかし、この研究からは、ここで得られた示唆を解決して心臓の低温保存時間をさらに延長する方法を見出せないことも明らかだった。

だが、解決に向けて考え抜いたことで研究の原点に気付くことになった。研究対象である実験動物への帰結だった。これまで常識的に用いてきた市販のラットやモルモット、ウサギなどの実験動物は、体温が低下して臓器が低温に曝されることは一生を通してあり得ないので、低温に対する耐性を発達させているはずはないとの考えに至った。

“体温が低下しても生存できる哺乳類”の発想が一気に浮かび、冬眠研究の最初の扉が開かれることになった。

## 5. 低体温に適応する心筋細胞

その後間もなく、冬眠動物であるシマリス（齧歯目、リス科）の心臓研究を開始した。韓国から輸入されていた野生のシマリスを購入して、2年間をかけて実験室で冬眠を起こすことに成功した個体から心臓を摘出し、心室から切り出した乳頭筋標本を用いて電気生理学的実験を行った。最初に得られた細胞膜活動電位記録は、冬眠していない活動期の心筋との比較から、細胞膜のCaイオンチャンネルを介して流入するCaイオンが著しく減少していることを示していた。しかし、それにも関わらず、収縮力が活動期とほとんど変わらないのである。細胞内に流入するCaイオン量の減少にもかかわらず収縮力が変化しないとの矛盾に答えを見出すのに、その後、ほぼ5年の時間が費やされた。

先ず明らかにしたことは、冬眠中の心筋細胞ではCaイオンチャンネルを介するCa流入がほとんどなく、細胞内Caイオン貯蔵器官である筋小胞体からの遊離によって収縮が起こされていることであった<sup>8,10</sup>。Caイオン流入が起こらない原因は、膜脱分極後早期に活性化されるKイオンチャンネルが強く活性化された結果、膜電位が電位依存性Caイオンチャンネルの活性化閾値以下に早期に再分極されてチャンネルの活性化が抑制されたためと分かった<sup>11</sup>。ところが、サイクリックAMPを介して作用する薬物でこのチャンネルを活性化したところ、Caイオンが多

量に流入するにも関わらず収縮力に何ら影響しないとの奇妙な結果が得られてきた<sup>10</sup>。

この問題を解決したのは、筋小胞体のCa-ATPaseを抑制する薬物を用いた実験であった。筋小胞体は、細胞の微細構造の知見から、細胞膜下で収縮繊維を包むように網目状に配置されており、筋小胞体から遊離したCaイオンを小胞体膜のCa-ATPaseにより直ちに再取り込みして細胞質Caイオンを減少させる。冬眠中の心筋細胞では、この取り込み能が著しく増大されていたのである。その結果、サイクリックAMPを介して細胞外から多量に流入するCaイオンは筋小胞体に取り込まれ、収縮繊維に達しなかったために収縮が起こらなくなった。筋小胞体のCa-ATPaseを抑制する薬物での処理がCaイオンの流入に見合った収縮を回復させたことで、このことが判明した<sup>12</sup>。

以上の結果から、冬眠中の心筋細胞では、Caイオンチャンネルを不活性化することにより細胞外からのCaイオン流入を抑制し、一方では、細胞内の筋小胞体のCaイオン取り込み能を増大して収縮に十分なCaイオンの供給と再取り込みを可能にしていることが明らかになった。これらの一連の研究によって、この変化が、低温で機能不全に陥り傷害される心筋細胞を保護するとの以下の考えが初めて提示された<sup>13,14</sup>。

通常的心筋細胞では、活性化したCaイオンチャンネルの不活性化過程が低温により遅延するために開口時間が著しく延長され、その間、細胞外のCaイオンが多量に流入して細胞内濃度が異常に高まる。この細胞質のCaイオンを排除するための機構（Ca-ATPaseやNa-Ca交換タンパク質）も低温により機能が低下しているため、細胞内に多量のCaイオンが残留することになる。そこに次の刺激によるCa流入が繰り返されると、細胞内のCaイオンは排除不能な濃度まで高まり、最終的に収縮状態で停止する。その後、細胞内に多量に残留したCaイオンは、種々のCa依存性プロテアーゼやホスホリパーゼを活性化して酵素や膜脂質を分解し、ミトコンドリア内に蓄積してこれを破壊するなどの細胞に致命的な傷害を与える。冬眠中の心筋細胞に起こったチャンネルの不活性化と筋小胞体の機能強化は、細胞質にCaイオンが過剰に負荷されることを防止して細胞が傷害されるのを防いでいることが分かる。そればかりではなく、強化された筋小胞体でのCaイオン遊離と取り込みの循環による収縮の制御は、エネルギー消費を最小限にする細胞内リサイクル機構でもある。

以上の考えから、冬眠中の心筋細胞で明らかになったCaイオン調節機構の変化は、最小のエネルギー消費で細胞へのCaイオン過剰負荷を回避させ正常に機能させるための調整であり、細胞を低温から保護する生理システムとして位置づけられる。さらに重要な点は、調整される機構が冬眠動物に特異ではなくヒトや他の非冬眠動物の心筋細

胞にも共通であり、これを用いて低温耐性を実現していることにある。この事実は、我々非冬眠動物の心臓でも同様にして低温耐性を増強できるとの重要な示唆を与える。上述したCaイオン調節の変化は、その後、シマリス以外の冬眠動物であるジリスやウッドチャックの心臓でも同様に起こることが報告され<sup>15,16)</sup>、ここで提案したシステムが低温への適応に共通して機能していることが明らかになってきている。この原因に関しては、冬眠動物の心筋から粗精製された筋小胞体標品で<sup>45</sup>Caを用いたCa取り込み能の増大や筋小胞体内のCa結合タンパク質の結合能の変化を示唆した報告があるが、決定的な生化学的究明には至らず今後の課題となっている。

## 6. 低温からの解放：自律的な生理システム

冬眠中の心筋細胞で発見された変化は、その後の研究で、23℃の室温で飼育して体温低下を起こせない個体でも時折観察されることが明らかになった。この困惑させる結果が、心臓の低温保存を目指した研究から冬眠機構の解明への扉を開くのである。

常体温の個体で観察された冬眠様のCaイオン調節の変化が、暦上の冬季に対応した時期に観察されることに気付くのは2年ほど経ってからであった。この間に心筋から得た実験結果を元にして、それらの収縮が二つのCaイオン供給源、即ち、細胞外からのCaイオン流入と筋小胞体からのCaイオン遊離、に依存する度合いを調べた。その依存度を実験月に対してプロットしたところ、秋季から冬季にかけての心筋では、冬眠中と同様の変化が起こっていることが明らかになったのである<sup>17,18)</sup>。

この結果は、これまで冬眠中の心臓で見出されてきた変化が体温低下していない個体でも冬季には既に起こっていることを示しており、体温低下はこの変化の原因ではなく結果として起こると考えられた。つまり、変化前の心臓では低下した体温では機能できず生存できないため、冬眠前に低温下で機能できる心臓に調整されているのである。しかもこの変化が23℃の一定の室温下で季節性に起こるとの事実は、季節性に制御されて心臓を変化させる機構が体内に存在することを推測させた<sup>17,18)</sup>。さらに、この推測は、生存に不可欠な脳神経系や免疫系などの主要器官でも心臓同様の変化によって低温耐性の増大を起こすとの考えへと拡張できるのである。

ここでの発見は、心筋のCaイオン調節の変化を誘導する機構のみならず、冬眠可能な生体への適応を調節する体内制御システムへのアプローチが、体温低下を起こすことなく可能であることを示唆している。この制御システムを明らかにすることは、心臓だけでなく生体を低温保存するという従来の冬眠研究が目指して果たせなかった夢の実現に大きく近づくことを意味する。これによって、筆者は、

心臓研究の役割はほぼ終わったとの結論に達して次のステップである冬眠を制御するシステムの究明へと進むことになった。

## 7. 冬眠物質探索の背景

前述の考えから、心筋細胞のCaイオン調節機能の季節性の変化が冬眠を制御するシステムの支配下にあることは容易に想定できた。つまり、この機能変化は季節性に起こされる冬眠制御の生理的指標となり得るのである。これを指標にして鍵となる物質を探し当てることができれば、制御システムへのアプローチが可能になると考えた。しかし、最大の難点は、心臓の摘出は実験個体の死を意味し、同一個体でそれ以後の生理学的実験が不可能になることであつた。このことは生理現象の原因を究明するには致命的で、必ず行き詰まるとの考えがあつたので、生存個体での解析が可能な細胞外分子の量的変化へと指標を移すことを考えた。このことは、単に分子指標の探索にとどまらず、冬眠の制御に深く関わる分子に行き当たる可能性を含んでいる。

冬眠を誘導する物質の探索では、1930年代には既に冬眠動物の脳や幾つかの組織から抽出したとの報告を見出すことができる<sup>19)</sup>。これ以前の19世紀末から20世紀初頭には既に取り組みが始まっていたであろうことは容易に想像できる。その後、1960年代になってから、冬眠中のジリスから採取した保存血清を夏季の冬眠していない個体に注入して低温暴露すると冬眠を開始するとの実験から、血中に冬眠のトリガーとなる因子(hibernation induction trigger: HIT)の存在が初めて報告され話題となった<sup>19)</sup>。しかし、その同定は現在もなされておらず、また、同種の冬眠動物を用いた追試実験からは、生理食塩水の投与でも冬眠が誘導されたとの結果も報告された。この結果は、冬眠誘導実験の困難さを露呈した。その一因は、ジリスが容易に冬眠を発現するとの理由から冬眠研究に最も良く用いられてきたにも関わらず、自発的な冬眠発現の時期や期間が詳細に研究されていないことにある。その後の研究からは、内因性のアヘン様物質がHITの実体ではないかとの説が出されたり、1980年代初期には、冬眠動物の幾つかの組織からの粗精製物が代謝を抑制して体温を数℃低下させる効果を持つとの報告がなされたが、何れも生化学的同定や冬眠に繋がる生理学的実証はなされていない<sup>6)</sup>。このような経過を経て、冬眠を誘導する物質の存在は懐疑的となり報告はなされなくなった。我々が冬眠に特異的な因子の探索に乗り出したのは、このような時代背景があつた。

## 8. 冬眠特異的タンパク質複合体の発見

心臓の機能変化を指標にして冬眠に相関する分子を探索するには、独自に作成した探索規範が非常に重要な役割を

果たした。この規範の中心には、冬眠発現が“個体レベルで季節性に制御される遺伝的要因による”との考えがあった<sup>20</sup>。これに従って、2年間をかけて50頭を超す個体から異なる季節に心臓を摘出し血液を採取して、心臓機能変化にリンクして変化する血中タンパク質を探索した。

最終的に、心臓機能変化に見合って顕著に変化する4種の異なる分子量 (SDS-PAGE 上で 20kDa, 25kDa, 27kDa, 55kDa) を持つタンパク質を選別した<sup>18</sup>。何れも、分子ふるいクロマトグラフィーで 140kDa 画分に溶出し、冬眠中に顕著に減少するものだった<sup>21</sup>。アミノ酸配列を決定するための精製過程で、これらが血中で複合体を形成して同一画分に存在することと、55kDa のタンパク質だけは単体でも存在することが明らかになった。これらを冬眠特異的タンパク質 (hibernation-specific protein: HP) と命名してそれぞれの分子量を付加して区別した。

これらの4種のタンパク質は全てが新規な配列を持つもので、HP20, HP25, HP27 は各々 173, 187, 185 のアミノ酸で構成され、N 末端には何れも約 40 残基のコラーゲン様ドメイン (Gly-X-Y の繰り返し配列) があり互いに三重らせんを形成して、この両端に位置するシステインによる分子間ジスルフィド結合で安定化されてヘテロ三量体 (HP20c と呼ぶ) となっている<sup>21-23</sup>。これらは互いに約 40% の相同性を持つファミリータンパク質である。HP25 と HP27 は各々 1 カ所に糖鎖が付加された糖タンパク質であり、HP25 は点変異によりさらに糖鎖が付加された高分子化異性体 (HP25s) が存在する。一方、HP55 は 389 アミノ酸からなり、セルピンスーパーファミリーに属するプロテアーゼ阻害因子の  $\alpha 1$  アンチトリプシンに高い相同性を持つが、活性中心の配列が異なる新規スーパーファミリーであった<sup>21</sup>。さらに、プロテアーゼ阻害実験からエラストラーゼを強く阻害することも明らかになっている<sup>23</sup>。

各 HP は何れも肝臓で特異的に発現しており<sup>22</sup>、HP20c と HP55 は疎水性結合により複合体を形成して血中に分泌されている<sup>21</sup>。冬眠していない時期 (活動期) の血中には数百 nM 存在し、冬眠中には約 1/10 まで減少する。しかし、単独で存在する非結合型の HP55 は冬眠中でも活動期とほぼ同程度が血中に存在しており、HP20c に対するスベアーとして働いていると考えられる。このように HP20c にプロテアーゼ阻害因子である HP55 が結合していることから、血中に多量に存在する HP 複合体は不活性型と考えて、冬眠中には組織に移行して機能するために血中から減少すると推測していた<sup>21</sup>。

さらに、HP 複合体の冬眠動物種に対する特異性を調べるために、齧歯目リス科に属する冬眠種 (ジリス, ウッドチャック) と非冬眠種 (タイワンリス) の血液を HP に対する抗体を用いて検討した結果、冬眠種に特異的に検出され<sup>21, 24</sup>、タイワンリスには HP 遺伝子は存在するが発現抑

制されていることが明らかになった<sup>22</sup>。この発現抑制は、プロモーター領域の塩基置換が主な原因であることも分かってきた<sup>25</sup>。このように、HP 複合体は冬眠に極めて高い特異性を持つことと、冬眠しない近縁種では発現抑制された HP 遺伝子を持つことが示されたのである。

かくして、心臓機能の季節性変化を指標に冬眠に特異的な新規タンパク質が発見され、冬眠研究史上初めての出来事となった。これによって、冬眠が遺伝的な因子で制御される可能性が初めて提示され<sup>21</sup>、従来の冬眠研究の進め方を再考して転換する必要性に迫られることになる<sup>26</sup>。これを契機にして、冬眠研究に遺伝子発現解析の導入が盛んに行われることになるが、今日に至るまで冬眠に特異的なタンパク質は HP 以外には見出されていない<sup>7</sup>。

## 9. HP 複合体の年周期性調節

HP 複合体は冬眠中に減少することから、HP の冬眠における意義を見極めるには慎重な研究が必要であった。この見極めには、冬眠現象自体の制御特性を明確に知る必要があったが、季節性に発現する冬眠の正確な周期性などの生理学的特性を、環境要因 (温度や照明時間) を制御した実験室内で長期的に調べた研究は、Pengelley ら<sup>27</sup> の予備実験以外にはほとんどなかった。特に、シマリスでの研究は皆無であった。そこで、シマリスの一生を通じて、体温と血中の HP レベルの変化を計測することと、同時に、HP が冬眠中に血中から減少する原因の究明を計画した。

冬眠中に観察された HP の減少は肝臓で発現する HP mRNA 量の減少に相関することが分かり、以前に推測した血中から他の組織や器官への移行のためではなく、遺伝子発現抑制による HP 産生量の低下が原因であることが明らかになった。この結果は、冬眠における HP の意義を考察する上で重要な機会を与えることになった。即ち、HP が心臓機能変化に相関して変化することや、冬眠する動物種に特異的に発現する新規タンパク質であること、血中での複合体は不活性状態と推測されること、減少時期でも生理的には十分な血中濃度が維持されることから考察すると、冬眠に必要な因子との結論に至ったのである。

HP 発見後に開始した体温変化の長期計測によって、数年の時間経過とともに冬眠発現の特性が明らかになってきた。結局、一定環境 (5°C, 恒暗) に設定した実験室でシマリスは 11 年余の驚異的な生存期間を記録することになる<sup>28</sup> (図 2)。この結果、冬眠は個体に固有の年周リズム (5 カ月から 13 カ月) に従って起こり、冬眠開始から終了までの期間 (冬眠期間) も個体ごとに異なる (3 カ月から 7 カ月) ことが明らかになった。しかし、同一個体では、これらのリズムと期間は一生を通じて規則正しく刻まれており、体内に固有の年周タイミング機構が存在することが示唆された。冬眠と血中 HP 量の関係からは、冬眠開始前か

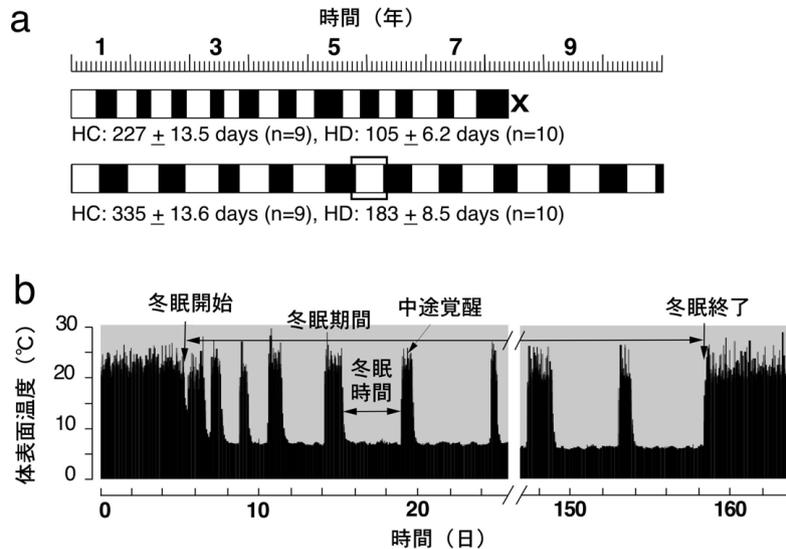


図2 体内で産生された free-run 状態の冬眠リズムと体温変化

a: 5°C, 恒暗環境で飼育したシマリスの体表面温度測定記録 (b) を元にして作成した10年間の冬眠リズム (黒部分: 活動期, 白部分: 冬眠期, X: 死亡). 異なる冬眠周期 (HC) と冬眠期間 (HD) を持つ2個体を代表例として示した. b: aの冬眠リズム決定のために体表面温度計測システム (文献30参照) により測定した体温変化. 図aの□で囲まれた部分を例として示した. (参考文献28から改変)

ら HP は負の調節により減少を開始し, 冬眠中は低値を維持して, 冬眠終了前に元の状態へと増加して冬眠が終了することが分かった. このパターンが, 各個体に固有の冬眠リズムと期間に同期することから, HP 複合体は体温低下に先行して年周タイミング機構により制御された冬眠発現に重要な分子との示唆が得られた<sup>28,29)</sup>.

さらに, 冬眠をさせていない個体の研究から, HP が体内で作られる年周リズムにより制御されることを明確に示す結果が得られてきた. 以前の心臓研究から, Ca イオン調節の変化は体温低下に依存しない季節性の調節を受けることが明らかになっていたので, HP 複合体が冬眠に重要ならば, 同様の調節がなされていると考えた. そこで, 体温低下を起こせない一定の温暖環境 (23°C, 12時間明暗周期) で数年間シマリスの血中 HP 量変化を調べた. この間, 体温低下を起こさずに常体温を維持したにも関わらず HP の年周期性調節が冬眠個体と同様に観察され, しかも, 血中 HP 量の低下時期に 5°C の低温に暴露することで体温が低下することも明らかになった<sup>28)</sup>. つまり, 血中 HP 量の調節は体温低下とは無関係に年周リズムにより制御されており, その調節が冬眠発現に不可欠であると推測された.

この推測の強い傍証となったのが, 冬眠不能なシマリスの存在であった. シマリスには少数ではあるが冬眠不能な個体が存在しており, 5°C 環境下で一度も体温低下を起こすことなく一生を終える. この個体では, 肝臓での HP 産生と血中 HP 量は冬眠可能な個体の活動時期とは何ら変わ

らないが, 血中 HP を減少させる負の調節は起こらない. このことは, 冬眠には HP の年周リズムによる調節が重要であることを示していた.

以上の結果から, 低下した体温で生存を可能にする冬眠には, 体内で産生される年周リズムにより制御された HP 複合体が重要な役割を担うとの推測がなされた. 即ち, 体内で HP が調節されるのは年周リズムによってであり, 体温低下 (即ち, 冬眠) はその結果として観察される現象との理解が得られた.

## 10. HP 複合体の標的器官

これまで述べてきたように, HP 複合体の冬眠における重要性は幾つかの異なる観点から得られてきた. 1) HP 複合体の変化が, 低温耐性を生む心筋細胞の Ca イオン調節の変化と同様に年周リズムにより制御されること, 2) HP 複合体の負の調節が冬眠に不可欠であること, 3) 負の調節による産生減少時でも生理的には十分な血中濃度であること, 4) 冬眠種に特異的に発現すること, である. このことは, 冬眠時期に HP が血中で減少するにもかかわらず, 体内で冬眠制御に重要な役割を担うことを確信させた. さらに, HP の冬眠への関与を懐疑的にさせた血中 HP 量の減少が, 逆に, 標的器官の想定には決定的な意味を持っていた. なぜなら, 作用部位では血中量の変化に逆行しなければならないからである.

末梢の血管壁は有窓構造であるため, 血中 HP は自由拡散により体液中に移動して末梢器官には同濃度存在すると

考えられ、事実、そうであった。しかし、脳血管には血液との間に関門が存在し、血中から脳内への高分子成分の移動は細胞内輸送を介して厳しく制限されている。つまり、HPが増加する標的器官として、血中HP量低下が単純には反映されない脳を想定することができたのである。

そこで、脳室内を満たし血液から脳実質へと物質を輸送する脳脊髄液を調べた結果、免疫化学的にHPを検出した。脳脊髄液中のHP濃度は、活動期には血中の1/1000以下と僅かであったが、血中HPの減少に同期して増加を始め、その後冬眠が開始された。脳脊髄液中HPは冬眠の中期に最も増加し（活動期の約二十倍）、その後減少に転じて冬眠終了前には活動期の濃度へと急激に低下した（図3）。HP増加時期には、脳脊髄液を産生する脈絡叢上皮細胞中に抗HP抗体の強い陽性反応が検出され、リアルタイムRT-PCRによりHP mRNAの発現が認められなかったことから、脈絡叢を介する脳内輸送によってHPが能動的に増加したことが明らかになった<sup>28)</sup>。

さらに、脳脊髄液中のHP複合体は増加するだけでなく、血中ではHP20cと会合していたHP55が解離していた<sup>28)</sup>。即ち、血中では不活性化されているHP複合体は脳で活性化されて作用する、との強い示唆が得られた。解離したHP20cとHP55は脳脊髄液中で共存しているにも関わらず会合体を形成しないことから、活性型と考えられるHP20cでは立体構造の変化が推測されている。この結果、肝臓での産生が年周性に抑制されて血中濃度が低下するHP複合体は、脈絡叢を介して脳に輸送されて活性化され、冬眠を制御するとの考えに至った。

ここでの実験結果は、脳脊髄液関門が140kDaもの高分子タンパク質複合体を細胞内輸送し、しかも解離型へと構

造を変化させて活性化すると驚くべき機能を持つことを示した<sup>28)</sup>。これまで、摂食調節ホルモンとして肥満との関与が知られているleptinや、細胞の成長や発達を調節するインスリン様増殖因子も脈絡叢を介して脳内に輸送されとの報告もあり、脈絡叢は脳神経機能を調節する末梢からのシグナル伝達の経路として重要な役割を担うと考えられる。

## 11. 冬眠を制御する初めての因子

活性型と推測されるHP20cは脳を標的とするとの推測ができたので、長年の目的であったHPの冬眠における生理的意義の究明が可能となった。これまでの研究結果から、血中HP複合体からHP55が解離して脳内でHP20cが増加すると冬眠が可能となるので、冬眠（即ち、低体温）状態への生体の適応に重要な因子と考えられる。そこで、脳内HP20cの機能を特異的抗体を用いて遮断して冬眠への効果を検証することとした。

この検証実験の重要性は言うまでもないが、これには実験の信憑性を揺るがしかねない人為的誤差が含まれる可能性が考えられた。例えば、抗体投与時期が冬眠終了時期に重なると抗体効果の有無とは無関係に見かけ上冬眠抑制効果が観察されるし、脳内HP20c濃度の生理的変動によっても抗体効果に重大な差が生じる。これらは、HPの検証に深刻な障害となるので、以下の方法でこの問題を解決した。前述したように、冬眠が体内の年周リズムにより制御され、各個体の一生を通じて固有の周期と期間を示すとの証拠が得られていたので、数年間をかけてこれを決定した個体を実験に用いた。さらに、脳内HP20cの濃度は冬眠期間を通してダイナミックに変化して、半ばで最大となる

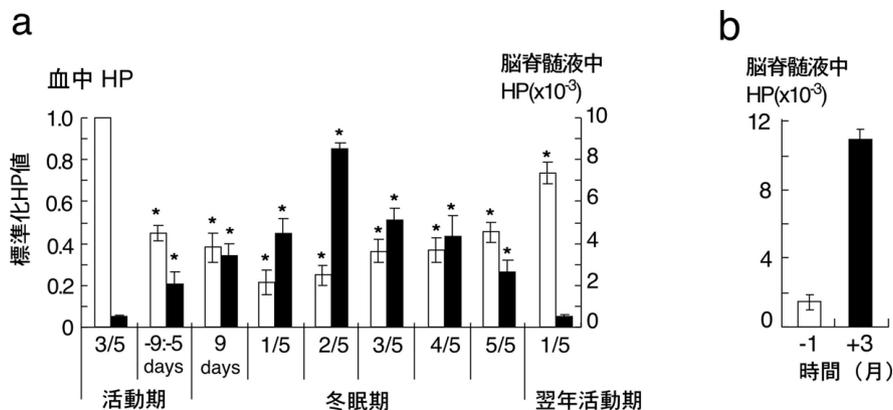


図3 活動期と冬眠期の血中および脳脊髄液中のHP複合体量の変化

a: 5℃, 恒暗環境下での血中(白棒)と脳脊髄液中(黒棒)のHP量変化。横軸下の分数字は、活動期間と冬眠期間を各々5等分して、時間の経過に従って1/5~5/5までを順次区分して表した。冬眠開始直前と直後のHP量は、各々、5~9日前(-9:5 days)と9日後(9 days)として示した。b: 23℃, 12時間明暗周期下で冬眠を妨げた個体での脳脊髄液中HP量の変化。増加開始1カ月前(白棒:-1)と3カ月後(黒棒:+3)を示した。(参考文献28から改変)

ことも突き止めていたので(図3), 実験中にこの濃度変化による誤差を最小限にとどめるため, HP20c濃度が比較的一定である期間に分割(前, 中, 後期)して研究を行った。これらの問題解決には, 生体に非接触, 非侵襲で長期的に体温変化を計測するために開発した赤外線カメラを搭載した体表面温度自動計測システムが大きく貢献し, これによって, 冬眠開始と終了時期, 冬眠期間中の低体温時間, 中途覚醒時間を個体の自由行動下で正確に計測することが可能になった<sup>28,30)</sup>(図2)。

さらに, このシステムは, 本研究の最重要課題であった, 抗体効果の量的解析に不可欠な冬眠の定量化の問題も解決した。従来, 冬眠現象は体温低下として定性的に扱われてきたため, 量的変化として定量化を考えた前例がなかったのである。この定量化の基本となる考え方として, 冬眠を“低体温を許容する能力”と見なし, 能力が高いほど長時間の低体温を許容するとの独自の定義づけをした。つまり, “低体温を許容する時間量(冬眠時間)”として冬眠能力を定量化したのである<sup>20,28)</sup>。

このような前段階を経て, HP20cに対する抗体はシマリスの側脳室内に留置したカニューレを介して浸透圧ポンプにより連続的に投与され, 抗体は濃度依存的に冬眠時間を短縮することが初めて証明された。冬眠前期と後期での抗体投与では, 冬眠時間が平均80~90%抑制され, 脳内HP20c濃度の最も高い中期でも平均70%に達した。前期では, 抗体投与により体温低下を完全に妨げることも成功し, 後期では, 脳内HPの自然減少と抗体による阻害の相乗効果と考えられる冬眠の早期終結も起こすことができた。冬眠終結個体以外では, 抗体投与終了後には冬眠時間は投与前の状態に回復することも分かった。このように, 抗体による脳内HP20cの阻害は冬眠(低体温)許容時間を短縮し, 投与終了後には再び脳内に増加した活性化HP20cにより回復することが示され, 脳内HP20cが冬眠に不可欠な分子との結論に至ったのである<sup>28)</sup>。

## 12. HP複合体発見の意義と課題

冬眠現象の解明には, 二つの大きな謎を解かなければならない。冬眠を制御する内因性の年周リズム産生機構と, 低体温に対する生体の耐性を増強する調節系である。前者の理解は, 年のタイミングを作り出す分子の実体とそれを末梢へと伝達するネットワークを, 後者は, それを介して細胞や組織, 器官の機能を調節して冬眠を可能にする仕組みを明らかにするはずであり, その結果として冬眠を可能にする体内システムの全貌が解明できると考えられる。

発見されたHP複合体は, 年周時計の制御下にある初めての分子なので, その調節因子を上流へとたどることで年周リズムの伝達因子と発信部位を探索できる。さらに, HP複合体は冬眠動物種に特異的であり, 脳で活性化され

て低体温許容能を増大させることから, 生体の低温耐性を究明する必須分子と考えられる。既に, HPのこれまでの研究によって, 脳と末梢を結ぶ冬眠を制御する分子システムのモデルを提唱している<sup>28)</sup>。また, 冬眠に必須なものは先天性の特異な細胞構造や機能ではなく, むしろ後天的に行われる調整であり, これを調節する因子が冬眠可能な生体へのスイッチングの鍵を握るとの推測もできた。この因子の最も有力な候補として, HPが初めて見出されたことから, HP受容体の同定や局在性, HPの機能や作用機序, HPの冬眠における直接効果, HP調節シグナル因子とその経路, さらには, ラットなどの非冬眠動物への応用を研究する基礎は築かれた。今後, HP複合体を脳に輸送して活性化する調節因子の同定が急務であるが, これらの課題の究明は時間の問題であり, その進行に伴って, 人工的な冬眠の制御もそれ程遠くない将来に可能になってくるだろう。

## 13. HPと冬眠の応用, 将来展望

人工的な冬眠制御を可能にすることは, 低体温を許容する細胞への調整機構の理解を意味する。これまで, 冬眠中の生体では, 0℃近い低体温での生存に加えて, 致死量の放射線や細菌, 発がん物質に対する耐性が増すことや, 脳や心筋が虚血やCa傷害から防御されることが報告されてきた。このことは, 低体温のみならず致命的な病因から生体を保護する機構が冬眠と表裏一体であることを示している。低体温は細胞のイオン平衡やエネルギー代謝の維持を強く障害して主要器官を機能不全や壊死に至らしめたり, 免疫能を極度に低下させて細菌やウイルス, がんなどへの抵抗性を失わせることから, HPが生体の低体温許容能を増大するとの結果は, これらの重篤な疾患に対するHPの強力な薬理効果を想像させる。実際, ヒトでもHPに構造が類似したタンパク質が存在しており, 免疫機能や糖, 脂肪の代謝に関わることが報告されている<sup>31,32)</sup>。さらに, 冬眠期間には, 摂食抑制と体内脂肪代謝の促進により体重の著しい減少が起こり肥満を解消するし, アルツハイマー病に類似する神経原繊維の変性が可逆的に起こる<sup>33)</sup>。つまり, HP複合体には, 現代医療が直面している深刻な疾患の治療や予防に新たな突破口を開く大きな可能性が秘められている。

さらに, HPの発見によって, 冬眠可能な生体への切り替えが体温低下とは無関係に37℃の正常体温で起こることが明らかにされた。このことは, 冬眠を体温低下による代謝抑制と考えてきた従来の概念を一変させ, 内的な調節機構による生体保護が冬眠の本質との考えを提示した。

この考えを強く支持する寿命研究の予備的結果も既に得ている。年周リズムにより脳内HPが増加する冬眠個体では10年以上もの長寿が確認され, HPが増加しない冬眠

不能個体では約3年の短寿命であった<sup>28)</sup>。ところが、体温低下を妨害して正常体温で生存させた個体でも、HPが年周期で調節される個体の寿命は10年を超えることが明らかになった<sup>20,34)</sup>。この個体では、体温低下を経験しないので、代謝抑制による消費エネルギーの節減や細胞成分の劣化抑制などの低温効果はないにも関わらず、冬眠不能なシマリスや同じ齧歯目の非冬眠動物であるラットやマウス(2, 3年の寿命)の数倍の寿命を持つのである。つまり、この驚異的な長寿に深く関わるのは体温低下による代謝抑制ではなく、HPの年周期性調節なのである。このことから、HP調節は、寿命を短縮する致死的な疾患から生体を保護して健康を維持するとともに、寿命を延ばす機構に関与するとの推測ができる。

これまでの20余年の冬眠研究を通して、冬眠の本質に向かう幾つかの扉を開いてきた。今後、HPの研究は、冬眠に必須な役割が解明されるにつれて、健康維持を目指す予防医学は勿論のこと、現在では凍死を招く極度の低体温の医療応用や、老化や寿命の分子機構の究明に画期的な貢献をするだろう。我々の研究を通じて、驚異的な生命システムとしての冬眠機構の解明に海外からも熱い視線が注がれている<sup>35)</sup>。

**謝辞：**年周期で発現する冬眠の研究には気の遠くなるような年月が不可欠となる。辛抱強く研究を援助して頂いた(財)神奈川科学技術アカデミー(1994-1999年)とNASDA(宇宙開発事業団, 現JAXA)(2001-2003年)、およびその間の研究に従事して頂いた研究員と助手の方々に心から感謝したい。

## 文 献

- 1) 川道武男(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 31-99, 東京大学出版会, 東京.
- 2) 森田哲夫(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 3-23, 東京大学出版会, 東京.
- 3) 坪田敏男(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 213-233, 東京大学出版会, 東京.
- 4) 井深信男(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 316-326, 東京大学出版会, 東京.
- 5) 近藤宣昭(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 297-315, 東京大学出版会, 東京.
- 6) 近藤宣昭(2000)冬眠する哺乳類(川道, 近藤, 森田編), pp. 262-294, 東京大学出版会, 東京.
- 7) 近藤宣昭(2006)蛋白質 核酸 酵素, 51, 1847-1853.
- 8) Kondo, N. & Shibata, S. (1984) *Science*, 225, 641-643.
- 9) Kondo, N. & Shibata, S. (1983) *Gen. Pharmacol.*, 14, 597-602.
- 10) Kondo, N. (1986) *Circ. Res.*, 59, 221-228.
- 11) Kondo, N. (1986) *Experientia*, 42, 1220-1222.
- 12) Kondo, N. (1988) *Br. J. Pharmacol.*, 95, 1287-1291.
- 13) Kondo, N. (1997) in *Sleep and Sleep Disorders: From Molecular to Behavior* (Hayaishi, O. & Inoue, S. eds.), pp. 129-143, Academic Press, Tokyo.
- 14) 近藤宣昭, 近藤 淳(1998)日経サイエンス, 28, 64-72.
- 15) Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., & Zhou, Z.Q. (2002) *J. Exp. Biol.*, 205, 2957-2962.
- 16) Yatani, A., Kim, S.-J., Kudej, R.K., Wang, Q., Depre, C., Irie, K., Kranias, E.G., Vatner, S.F., & Vatner, D.E. (2004) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 286: H2219-H2228.
- 17) Kondo, N. (1987) *Experientia*, 43, 873-875.
- 18) Kondo, N. & Kondo, J. (1992) in *Circadian Clocks from Cell to Human* (Hiroshige, T. & Honma, K. eds.), pp. 89-96, Hokkaido University Press, Sapporo.
- 19) Wang, L.C.H. (1988) in *Advances in Comparative and Environmental Physiology 2* (Gilles, R. ed.), pp. 1-44, Springer-Verlag, Berlin.
- 20) 近藤宣昭(2006)科学, 76(9), 934-941.
- 21) Kondo, N. & Kondo, J. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 473-478.
- 22) Takamatsu, N., Ohba, K.I., Kondo, J., Kondo, N., & Shiba, T. (1993) *Mol. Cell Biol.*, 13, 1516-1521.
- 23) Kondo, J. & Kondo, N. (1996) in *Adaptation to the Cold* (Geiser, F., Hulbert, A.J., & Nicol, S.C. eds.), pp. 351-355, University of New England Press, Armidale.
- 24) Kondo, N. & Kondo, J. (1993) in *Life in the Cold* (Carey, C., Florant, G.L., Wunder, B.A., & Horwitz, B. eds.), pp. 467-473, Westview Press, Boulder.
- 25) Kojima, M., Shiba, T., Kondo, N., & Takamatsu, N. (2001) *Eur. J. Biochem.*, 268, 5997-6002.
- 26) Malan, A. (1996) in *Adaptation to the Cold* (Geiser, F., Hulbert, A.J., & Nicol, S.C. eds.), pp. 1-6, University of New England Press, Armidale.
- 27) Pengelley, E.T. & Asmundson, S.J. (1974) in *Circannual Clock: Annual Biological Rhythms* (Pengelley, E.T. ed.), pp. 95-160, Academic Press, San Francisco.
- 28) Kondo, N., Sekijima, T., Kondo, J., Takamatsu, N., Tohya, K., & Ohtsu, T. (2006) *Cell*, 125, 161-172.
- 29) Kondo, N. & Joh, T. (1996) in *Adaptation to the Cold* (Geiser, F., Hulbert, A.J., & Nicol, S.C. eds.), pp. 341-345, University of New England Press, Armidale.
- 30) 近藤宣昭(2004)赤外線サーモグラフィによる設備診断・非破壊評価ハンドブック((社)日本非破壊検査協会, 赤外線サーモグラフィによる非破壊評価特別研究委員会編, 寺田博之, 阪上隆英監修), pp. 118-122, 廣済堂, 東京.
- 31) Kishore, U.K. & Reid, B.B. (1999) *Immunopharmacology*, 42, 15-21.
- 32) Fruebis, J., Tsao, T.-S., Javorshchi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R.S., Yen, F.T., Bihain, B.E., & Lodish, H.F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2005-2010.
- 33) Arendt, T., Strijkstra, A.M., Hut, R.A., Rudiger, J., Zee, E.A. V., Harkany, T., Holzer, M., & Hartig, W. (2003) *J. Neurosci.*, 23, 6972-6981.
- 34) 近藤宣昭(1999) *Ther. Res.*, 20, 69-76.
- 35) Hastings, M.H. & Ebling, F.J.P. (2006) *Cell*, 125, 21-23.