

飢餓適応の分子基盤の解析

齊 藤 寿 仁

熊本大学大学院自然科学研究科 教授

諸 言

環境から栄養を従属的に得ている動物にとって、栄養が十分に供給されない環境へ適応する能力は、生命活動を持続させるうえで極めて重要である。しかしながら、環境がどのように変化するのは予測不能で、栄養不足の状況が長期にわたることも自然界では珍しいことではない。

生物は、進化の過程で頻発した環境変化に対する応答には相応の準備をしているが、めったに遭遇しない外的なシグナルに対しては順応できないことが多い。人類は長期にわたる絶食状態といった環境を避ける能力を身に付けたが、代わりに、そうした生体外から栄養補給が止められた状態に適応する能力を失ったかに見受けられる。

一般に栄養が不足する環境下で、細胞は速やかに代謝系を変化させると考えられている。例えば、栄養源を炭水化物から備蓄している脂肪に変えることで、低栄養条件に対する適応を試みる。オートファジーと呼ばれる自己鈍食作用が、タンパク質をアミノ酸に分解・再利用することも知られている^{1) 2)}。しかしながら、こうした知見は比較的短期間、低栄養状態を継続した実験から得たものである。おそらく、長期的な低栄養状態（飢餓状態）では、代謝やオートファジーに加えて、まだよく解析されていない、未知の生体応答も生じると考えられるが、その分子制御に関する知見はほとんど知られていない。その理由として、長期の絶食に耐える生物に関する知見が少なく、飢餓状態を実験室で再現できる高等脊椎動物のモデル生物が確立されていないことなどが理由として考えられる。

本研究では、1年間もの長期にわたり水槽内に水を満たし、低温下で飼育した本邦産アカハライモリ (*Cynopus pyrrhogaster*) を用いて、飢餓に対する適応応答を分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。比較対象として、十分量の餌が供給される常温下で飼育したイモ

リを用いた。イモリは手足の切断や眼球切除に伴う組織・器官の再生の脊椎動物に実験モデル生物として高校の教科書にでも広く紹介される水棲両生類である。当該研究室では、実験で使用するために飼育しているイモリに餌を与えることを忘れることがたびたびあったが、多くのイモリが死ぬことなく、見かけ上正常な状態で生育していることに驚かされることがたびたびあった。本研究は、こうしたイモリの持つ極限状況に対応する強靱な生命力に対する驚異の念が発端となった。

結 果

蒸留水を含む水槽の中でイモリを飼育した。温度は4度に保ち、2週間に一度、水の交換を行った。水槽内には蒸留水で満たし、餌は一切与えずに飼育した。この条件下で100匹のイモリ（メス）について観察したところ、60%は死ぬこともなく外見上は正常であった。この処理を行ったイモリを「飢餓イモリ」と呼ぶことにした。一方、常温の蒸留水を含む水槽内で赤虫を餌として飼育したイモリ（メス）を「飽食イモリ」とし、前者の処理をした



図1 飽食状態のイモリ（左）と長期間（1年）の絶食状態にある飢餓イモリ（右）

形態的には見分けがつかないが、代謝制御システムが大きく変化していると考えられる。

イモリの比較対象とした。なお、飽食イモリの1年間の生存率は約75%であった。飢餓イモリと飽食イモリそれぞれの肥満度をBMI指数（Body Mass Index）を用いて計測したところ、前者のBMIは0.0466で、飽食イモリのそれは0.0629で、絶食により肥満度が減少したことが明らかとなった。1年間の絶食状態で飼育したこうしたイモりを、長期の絶食に適応したモデル生物とした（図1）。

長期に及ぶ絶食（飢餓）状態に対するイモリの適応応答の機序を分子・細胞レベルで明らかにするために、まず飢餓と飽食のそれぞれのイモリから摘出可能な臓器

および血液を採取し、それらの細胞の形態観察を行った。細胞の観察はヒトの病理検査で一般的に用いられるHematoxin-Eosin（HE）染色を用いた。その結果、肝臓と血液以外の臓器にほとんど相違は観察されなかった。しかしながら、肝臓については、組織全体の形や、組織を構成する細胞の形などは飽食と飢餓イモリの間で大きな差異は観察されなかったものの、飢餓イモリの肝臓には図2に示すように、飽食に比べ多数の色素細胞が観察された。

一方、血液を飢餓と飽食のそれぞれのイモリから採取し、抗凝固剤としてヘパリンを用いて、薄層塗抹標本を

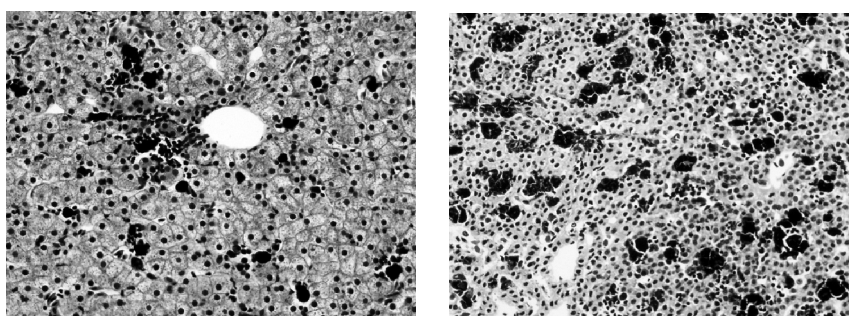


図2 肝臓のHE染色像
左：飽食イモリ 右：飢餓イモリ（100倍の観察像）

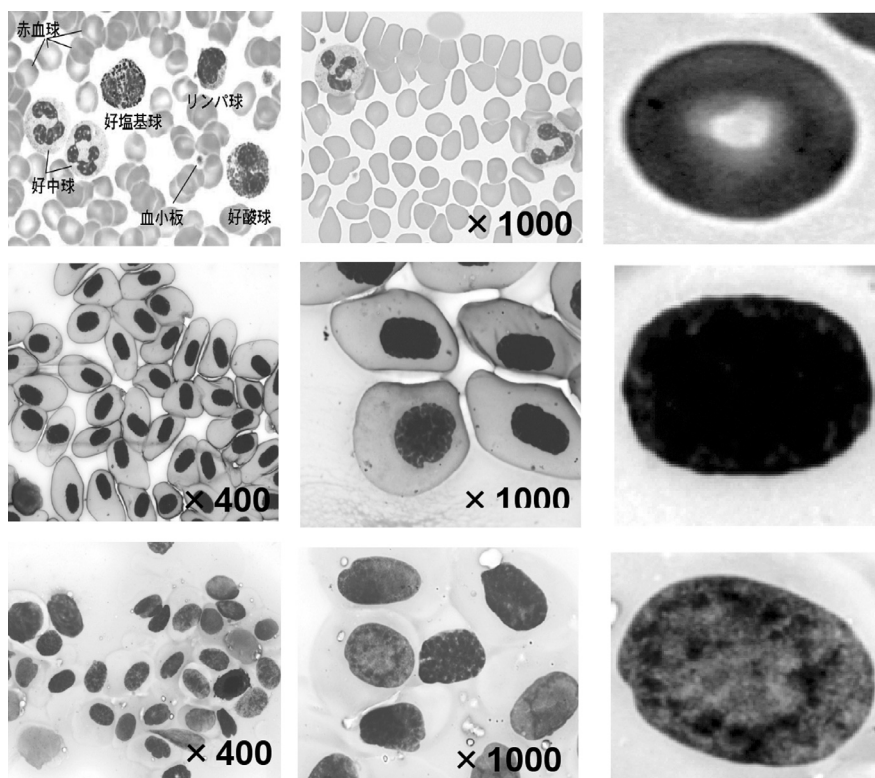


図3 ライト・ギムザ染色によるヒトおよびイモリ血液像
（上段：ヒト末梢血液像 中段：飽食イモリ 下段：飢餓イモリ）

作成し、ライト・ギムザ染色を行ったのが図3である。図に示すように、両生類のイモリの血液中の赤血球はヒトなどの動物細胞とは異なり有核で、凝縮したクロマチン構造が観察される。とりわけ飽食イモリの血液中に観察された赤血球では、核が明瞭でその内部のクロマチン構造が濃染されていることからクロマチンの大部分が高度に凝縮したヘテロクロマチンとして存在すると考えられる。それに比べて、飢餓イモリの赤血球核の染色は淡く、クロマチン構造は脱凝縮した状態にあると考えられた。

次に、飢餓と飽食イモリの赤血球核の長径・短径をそれぞれ計測したところ、飽食イモリの赤血球核は長径 $19.0\ \mu\text{m}$ 、短径 $12.4\ \mu\text{m}$ で、長径/短径比は 1.53 に対し、飢餓イモリのそれは長径 $29\ \mu\text{m}$ 、短径 $19.3\ \mu\text{m}$ で、長径/短径比は 1.45 であった。このことから、飢餓イモリの赤血球核の体積が飽食イモリに比べて増大していることが明らかとなった。

飢餓と飽食イモリのヘパリン処理した血液をサンプルとして蛍光免疫染色を行った(図4)。使用した抗ヒストン H3-K9 のメチル化修飾抗体と抗ヒストン H3-K27 のメチル化修飾抗体は2種類ともヘテロクロマチンのマーカーと考えられるヒストン H3 の修飾に対する特異的抗体である。飢餓イモリ赤血球中に見られた巨核赤血球を観察すると、H3K9、H3K27 は飽食イモリの正常サイズの赤血球核に比べて蛍光量が低く観察された(図4中の矢印で示した細胞)。

最後に、イモリの体中の全血液量の比較を試みた。全採血を行った結果、飽食イモリ一匹あたりに採取できるサンプル量は約 $200\ \mu\text{l}$ であるのに対して、飢餓イモリ

のそれについては、顕微鏡観察に必要最小量を得るのでさえ厳しい状況であった($\sim 100\ \mu\text{l}$)。

考 察

本研究では、アカハライモリに餌を与えずに1年間もの間、飼育可能なことを示した。これにより、長期絶食(飢餓)への適応システムの研究が可能な脊椎動物システムを構築できたと考えている(図1)。

本研究の結果、飢餓イモリと飽食イモリの間でいくつかの異なる点が明らかとなった。まず、臓器レベルでの比較から、飢餓イモリの肝臓において多数の色素細胞が観察された(図2)。また、最も、顕著な差異として血液の量と、血中の赤血球の形態、特に赤血球の細胞核内のクロマチン構造が変化することを見出した(図3、4)。絶食1年の赤血球核は飽食のものに比べ全体的に大きく、クロマチン構造が脱凝縮する傾向にあったのは予想してなかった。こうした現象の生理的な意義については、まだ十分理解されていないが、ヒトにおける病態とこの飢餓イモリにおける血液の変化との間の類似性を考えてみた。その結果、巨赤芽球性貧血の際におきる症状との類似性に思い至った。この疾患は葉酸や VB_{12} が欠乏することで DNA 合成障害が起こり、その結果、血球細胞の分化・成熟過程の制御が破綻して起こることが知られている³⁾。仮に、この類推が正しいとすると、飢餓イモリはヒトの貧血に類似の状態にあり、飢餓イモリは低酸素状態と類似の生理的な状況に陥っていると予想できる。赤血球は主に生体内に酸素を供給する働きが主であるが、極限環境(絶食、気温の低下、低酸素下等)では赤血球を脾臓で分解しそれをエネルギーに変えていると

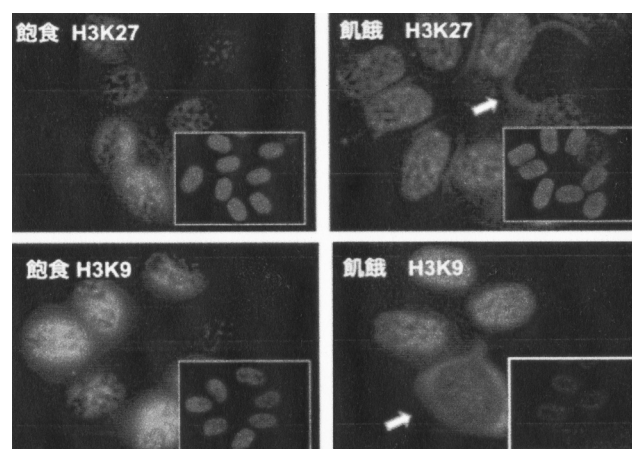


図4 ヒストン修飾抗体を用いた免疫染色

(左) 飽食イモリ血液 (右) 飢餓イモリ血液

(上) anti-ヒストン H3K27 メチル化抗体 (下) anti-ヒストン H3K9 メチル化抗体

いった報告もある⁴⁾。これは肝臓の色素細胞で作られる物質がホルモンに作用し、心拍数を抑え、酸素の消費を抑制することに由来すると考えられる。同様の代謝システムが飢餓状態において作動していると考えてはどうだろうか。

ところで、ヒトを含むほ乳類の雌が、妊娠期間中に栄養不足状態が長期にわたって継続すると、母体の代謝応答（飢餓応答）が胎内のヒストンやDNAのメチル化修飾といったエピゲノム制御に影響し、子供の発育や神経発達に障害が観察されることが報告されている。現在、なぜ長期の絶食に対し、その効果がエピゲノム変化を介して世代を超えて伝播するのかは不明であるが⁵⁾、本システムはアカハライモリのメスを用いているので、飢餓状態にあるメスに産卵させ、そこから生まれるイモリの解析が可能である。今後は、飢餓イモリの実験システムを用いて、世代を超えたエピゲノムに対する変化に対する解析も行っていきたいと考えている。

要 約

1年間、外部からの栄養補給を絶ったアカハライモリでは、1) 肝臓に多くの色素が蓄積し、2) 血液の量が減少し、血中の赤血球の形態、特にヒストンのメチル化

修飾の変化と脱凝縮したクロマチンが観察されることが明らかとなった。この現象は、ヒトの巨赤芽球性貧血の症状と類似性すると考え、飢餓適応の分子機序の一つに低酸素応答が関わる可能性を考察した。低酸素により体全体の代謝の低下が誘導されたと考えると、飢餓イモリに特有の貧血（血液量の減少）と肝臓の色素細胞の増加は、長期の絶食に対する、酸素消費と代謝量を調節する反応であると説明できる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、財団法人三島海雲記念財団から研究助成を受けました。ここに篤く感謝申し上げます。研究を遂行するにあたり、熊本大学大学院自然科学研究科博士課程前期1年の河田仁さん、同大学理学部理学科生物環境プログラム4年生の南早紀さんの協力を得ました。ここに深謝します。

文 献 等

- 1) T. Wang, et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 223-251, 2006.
- 2) K. Lenaerts, et al., *J. Proteome Res.*, 5, 2113-2122, 2006.
- 3) M. Spinazzi, et al., *Nat. Rev. Neurol.*, 6, 288-293, 2010.
- 4) G. Frangioni, et al., *J. Exp. Zool.*, 302, 123-131, 2005.
- 5) J. Foret, et al., *BMC Genomic*, 10, 472 (1-11), 2009.