

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06543

研究課題名(和文)次世代プロテオミクスを用いた細胞老化代謝ネットワークの全体像の解明

研究課題名(英文)Elucidation of metabolic network in cellular senescence using next-generation proteomics.

研究代表者

押川 清孝(Oshikawa, Kiyotaka)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50380051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、3種類の老化細胞を樹立し、それらに共通して発現が低下していたDNA合成関連酵素群の過剰発現およびノックダウン実験を実施することで、代謝酵素量の介入実験による細胞老化の制御が可能かを検証した。DNA合成関連酵素の一つである、Ribonucleotide reductase catalytic subunit M1 (RRM1)遺伝子の発現を正常細胞で低下させたところ、細胞の増殖が停止し、老化細胞の表現型を示すことを見出した。以上から、DNA合成酵素の発現を低下させることで細胞老化が生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞は増殖細胞とは異なった代謝状態を取ることが知られているが、これまでにさまざまな老化細胞の代謝ネットワークを対象にした解析例はほとんどない。加えてDNA合成関連酵素が直接、細胞老化を制御しているという報告は国内外において、あまり見当たらない。本研究により解明された細胞老化における代謝システムの分子機構は、老化研究において新たなメカニズムを理解する上で非常に重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we established three types of senescent cell lines (telomere shortening, oncogene-induced senescence, and oxidative stress-induced senescence) and measured protein abundance of metabolic enzymes using iMPAQT system. We found that DNA synthesis-related enzymes are commonly down-regulated in these cell lines. Down-regulation of ribonucleotide reductase catalytic subunit M1 (RRM1) in normal cells were growth arrest and resulted in a premature senescence-like phenotype (SA-β-Gal staining positive, up-regulation of p16 and p21 expression, and down-regulation of Lamin B1 expression). These results indicate that cellular senescence is caused by down-regulation of RRM1 expression.

研究分野：基礎生物学

キーワード：細胞老化 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

細胞老化とは不可逆的な増殖停止機構であり、重要な抗がん化機構の一つである。これまでに老化に伴い増殖が停止すると、増殖細胞とは異なった代謝状態を取ることが種々の証拠より示されている。複製誘導性老化においては解糖系の亢進が30年以上前から知られていたが(Bittles, A.H., et al. *Biosci. Rep.* 1984)、その機構や意義に関してはほとんど研究が進んでいなかった。近年、がんにおける代謝ネットワークの重要性や細胞老化のがん抑制機構としての役割が認識されたことで、その重要性が再認識され始めている。例えば、ATPレベルの低下やNAD⁺の低下が老化を促進することが示され、代謝変化が老化プロセスの一翼を担っている可能性が示唆されている(Zwerschke, W., et al. *Biochem. J.* 2003; Jiang, P., et al. *Nature* 2013)。また、がん遺伝子誘導性老化においてはTCAサイクルの活性化が老化の引き金となっていることが示されたが(Kaplon, J., et al. *Nature* 2013)、その一方でミトコンドリアの機能低下が老化を誘導することが明らかとなっている(Wiley, C.D., et al. *Cell Metab.* 2016)。このように、細胞老化と代謝システムの間には密接な関連性が示されているものの、統一的な理解には程遠い状況にある。

2. 研究の目的

本申請課題では、われわれが開発した『iMPAQTシステム』(Matsumoto, M., et al. *Nat. Methods* 2017)による網羅的定量プロテオミクスシステムを駆使して、細胞老化における各モデル細胞の代謝酵素の発現量情報を定量的に取得する。同時に代謝物量や転写産物量情報も取得することで細胞老化の代謝ネットワークを明らかにし、さらにネットワーク介入による老化制御の分子機構の解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

I. 細胞老化モデル細胞の樹立

老化細胞として①複製老化、②酸化ストレス誘導老化、③がん遺伝子誘導老化、の3状態の老化細胞を樹立する。具体的には、①正常細胞であるヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG-3)を用いて長期間培養することで複製老化した細胞を樹立する。②酸化ストレス誘導老化では、TIG-3に過酸化水素を添加することで老化細胞を得る。③がん遺伝子誘導老化では同じく、TIG-3にがん遺伝子 H-Ras(G12V)を導入してがん遺伝子誘導の老化細胞も樹立する。このように同一細胞株から異なる状態の細胞の作出は、由来が同じであることから細胞間の誤差を払拭でき、解析結果の解釈を容易にするために必要となる。

II. 全代謝酵素関連タンパク質の情報基盤多重モニタリング法の実施

樹立した各種老化細胞に対して、iMPAQT法による全代謝酵素の絶対定量計測を実施する。

III. 代謝物および転写産物の網羅的定量およびトランスオミクスデータ統合

各種モデル細胞における細胞内代謝物量をCE-MSを用いたメタボローム解析によって計測する。さらに、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施する。上記計測により得られた大規模定量情報を統合し、各種モデル細胞での細胞老化の代謝ネットワークを明らかにし、さらにその主因酵素を導き出す。

IV. 細胞老化関連酵素の老化制御の検証実験

各種老化モデル細胞に細胞老化での主因候補タンパク質を過剰発現やノックダウンすることで、細胞老化回避や代謝ネットワークに影響を与えるかどうかを検証する。

4. 研究成果

I. 細胞老化モデル細胞の樹立

①複製老化、②酸化ストレス誘導老化、③がん遺伝子誘導老化、の3状態の老化細胞を樹立した。これらを用いて以下の実験を実施した。

II. 全代謝酵素関連タンパク質の情報基盤多重モニタリング法の実施

1) ペプチド情報データベースの構築

われわれが開発した『情報基盤定量法』は多数のタンパク質の絶対量を同時に測定する新技術である。代謝酵素関連タンパク質の組換えタンパク質を小麦胚芽抽出液を用いた無細胞発現系を用いて作製し、その消化物を用いてLC-MS/MS解析によって感度良く検出されるペプチドの選定とその座標（LC上の保持時間、質量、および部分質量）の決定を行った。これらの情報を基にして質量分析計を用いた選択的定量法であるMRM (multiple reaction monitoring) 法を実施すれば大規模なタンパク質の絶対定量が可能となる。本研究では代謝酵素(約1,000種類)のペプチド情報の取得と定量のための最適化を行った。

2) 情報基盤定量法による代謝酵素の絶対定量

実際に、本方法を用いて3種類の老化モデル細胞からの代謝酵素の大規模絶対定量を行った。

III. 代謝物および転写産物の網羅的定量およびトランスオミクスデータ統合

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析も行い、得られた大規模データから、老化特異的に発現変動する代謝酵素群を抽出した。統合したデータから、老化細胞特異的にDNA合成関連酵素群の発現量が低下していた。

IV. 細胞老化関連酵素の老化制御の検証実験

DNA合成関連酵素群の過剰発現およびノックダウン実験を実施し、代謝酵素量の介入実験による細胞老化の制御が可能かを検証した。このうち、Ribonucleotide reductase catalytic subunit M1 (RRM1)遺伝子の発現を正常細胞で低下させたところ、細胞の増殖が停止した。このノックダウン細胞を詳細に解析したところ、老化細胞の表現型を示すことを見出した。RRM1の発現低下に伴い、p16, p21発現量の上昇およびLamin B1発現量が低下していた。また老化マーカーであるSA- β -Gal染色も陽性であった。以上から、DNA合成酵素の発現を低下させることで細胞老化が生じることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oshikawa, K. Matsumoto, M. Kodama, M. Shimizu, H. Nakayama, K. I.	4. 巻 39
2. 論文標題 A fail-safe system to prevent oncogenesis by senescence is targeted by SV40 small T antigen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2170, 2186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-1139-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama, M. Oshikawa, K. Shimizu, H. Yoshioka, S. Takahashi, M. Izumi, Y. Bamba, T. Tateishi, C. Tomonaga, T. Matsumoto, M. Nakayama, K. I.	4. 巻 11
2. 論文標題 A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15136-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kito, Y. Matsumoto, M. Hatano, A. Takami, T. Oshikawa, K. Matsumoto, A. Nakayama, K. I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62697-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 押川 清孝、高見 知代、松本 雅記
2. 発表標題 iMPAQT ver. 2による細胞内パスウェイ構造の定量的可視化の試み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中山 敬一 (Nakayama Keiichi) (80291508)	九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授 (17102)	
連携研究者	松本 雅記 (Matsumoto Masaki) (60380531)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
連携研究者	馬場 健史 (Bamba Takeshi) (10432444)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------