

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16145

研究課題名(和文) ゴルジ体の構造変化に着目した細胞老化現象へのアプローチ

研究課題名(英文) Study of the structural change of the Golgi during cellular senescence

研究代表者

衛藤 貫 (Etoh, Kan)

熊本大学・発生医学研究所・特別研究員

研究者番号：50867207

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)：本研究は、トランスクリプトーム解析を切り口に老化細胞におけるゴルジ体の構造変化に関する分子機構を明らかにする試みである。トランスクリプトーム解析は、高度なプログラミングの専門知識が必要であり、また、方法が標準化されていないため再現性に問題が生じる場合がある。そのため、初学者にとって非常にハードルが高く、また間違った解析をしてしまう恐れがあるという問題があった。そこで、簡便に再現性のあるトランスクリプトーム解析ができる環境を構築することを目的に、ウェブアプリ「RNAseqChef」を新規に開発した。本研究成果をまとめた論文はJ. Biol. Chem.に受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスクリプトーム解析は、分野を超えて利用される生命科学・医学研究における基幹技術である。実験の工程としてはキット化されており比較的簡便にデータを取得できる一方で、そのデータ解析は難易度が高くバイオインフォマティクスの専門家でなければ困難であった。今回開発したRNAseqChefはプログラミングの専門知識を必要とせず、データをアップロードするだけで自動的に解析・可視化・結果の取得ができるツールである。従って、様々な分野において研究促進につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the molecular mechanisms underlying the structural changes of the Golgi apparatus in senescent cells, focusing on transcriptome analysis. While transcriptome analysis is a powerful technique for understanding cellular state and dynamics, a series of data investigations, including differentially expressed gene analysis, data integration, clustering, functional analysis, and visualization, are considerably laborious for most researchers and scientists not specializing in bioinformatics. To remove the barriers to sequence data analysis in the research community, we have developed “RNAseqChef” (RNA-seq data controller highlighting expression features), a web-based platform of systematic transcriptome analysis that can automatically detect, integrate, and visualize differentially expressed genes and their biological functions. A paper reporting the development of RNAseqChef has been accepted for publication in the Journal of Biological Chemistry.

研究分野：細胞生物学

キーワード：RNA-seq バイオインフォマティクス 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

細胞老化とは、細胞内外からのストレスにより不可逆的に細胞周期が停止する現象を指す言葉である。この現象は、損傷した細胞の増殖を防ぐことができるので、癌抑制機構として働くと考えられてきた。しかし、近年の研究により、老化細胞によって産生・分泌されるタンパク質は、周囲の細胞の老化を誘導し、個体の老化に寄与することが示唆されている(図1左)。したがって、老化細胞における分泌現象“Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)”の解明は、加齢障害の予防・治療を目的とした創薬につながると考える。

ゴルジ体は、細胞に必須の分泌装置である。細胞内で産生されるほぼ全ての分泌タンパク質は、ゴルジ体を経由して細胞外へ分泌される。ゴルジ体は、正常な哺乳類細胞では核近傍で層状の構造を示すが、老化した細胞ではその構造を失い、断片化されることが報告されている(図1右)(J. Cell Sci. (2018) 131, jcs207217)。しかしながら、実は、老化細胞においてゴルジ体の断片化を引き起こす分子機構やその生理的意義は、これまでに着手されていない全くの未解決問題である。

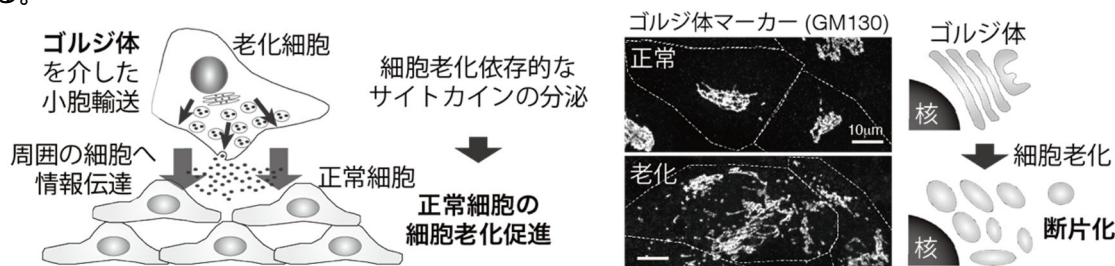


図1. 細胞老化が持つ負の側面(左)と細胞老化に伴い観察されるゴルジ体の断片化(右)

2. 研究の目的

細胞老化におけるゴルジ体の断片化は、細胞老化依存的な分泌現象を制御するために存在すると仮説を立てた。この仮説を検証するために、以下の二つの課題を本研究の目的とする。

[1] 老化細胞においてゴルジ体の断片化を引き起こす分子及びその分子機構の同定

[2] 細胞レベル及び個体レベルにおける老化現象とゴルジ体の断片化の関係性の解明

予備実験により、正常細胞と老化細胞では、ストレス応答様式が異なり、その結果として老化細胞でのみゴルジ体の構造変化が生じることを見出していた。そこで、複数種の非老化細胞と老化細胞の RNA-seq を実施し、老化細胞に特徴的な遺伝子発現を同定することで、ゴルジ体の構造変化に関わる分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

細胞老化の解析は、ヒト線維芽細胞 IMR90 を実験材料に、癌原遺伝子 HRasG12V の過剰発現により誘導される細胞老化モデルを利用した。siRNA を用いて、p53 と Rb のダブルノックダウン(DKD)を実施した。細胞老化誘導前に p53/Rb を DKD することで細胞老化を回避した細胞を、細胞老化誘導後に p53/Rb を DKD することで p53/Rb を機能欠損した老化細胞を作製し、RNA-seq 解析を実施した。また、コントロールとして、血清飢餓(0.1% FBS)により誘導される可逆的な分裂停止細胞(静止細胞)の RNA-seq も実施した。RNA-seq のデータ解析は、本研究で新たに開発した RNAseqChef を用いた。

4. 研究成果

・RNAseqChef (RNA-seq data controller highlighting gene expression features)の開発に関して

RNA-seq のデータ解析には情報科学の専門知識が不可欠であるため、簡単には活用できないという問題点があった。そこで、まずはこの問題を解決するために、全遺伝子の発現変動を自動的に解析・可視化するウェブアプリ「RNAseqChef」を新たに開発した。RNAseqChef は、2 群間の比較解析や 3 群間の多重比較解析、時系列データの多重比較解析、ベン図解析、エンリッチメント解析など、RNA-seq 解析に用いられる機能を包括的に備えており、直感的な操作で利用することができる(図2)。

RNAseqChef を報告した原著論文は Journal of Biological Chemistry (JBC) に受理された。また、当該論文は JBC の Editors' Pick に選出された。

・細胞老化のトランスクリプトーム解析に関して

新たに開発した RNAseqChef を用いて非老化細胞(正常細胞: Pro, 静止細胞: Qui, 老化回避細胞: Sen-escaped (Rb/p53 KD)) と老化細胞(老化細胞: Sen, Rb 及び p53 を機能欠損した老化細胞: Sen (Rb/p53 KD)) の計 5 条件の RNA-seq データを解析した。まず、以下の条件間に関して発現変動遺伝子を同定し、ベン図解析により老化細胞に特徴的な遺伝子を抽出した。

・ Pro vs Sen

- Qui vs Sen
- Sen-escaped(Rb/p53 KD) vs Sen
- Sen-escaped(Rb/p53 KD) vs Sen(Rb/p53 KD)
- Pro vs Sen(Rb/p53 KD)

分裂停止の影響を排除するために Qui を、HRasG12V の過剰発現の影響を排除するために Sen-escaped(Rb/p53 KD)を、Rb/p53 KD の影響を排除するために Sen(Rb/p53 KD)を比較対象に含めることで、真に細胞老化特異的な遺伝子発現の同定を目指した。その結果として、非老化細胞と比較して老化細胞で2倍以上の発現量を示す遺伝子として 315 遺伝子を同定することに成功した(図3上)。さらに、Molecular Signature database の Hallmark gene set を用いて、エンリッチメント解析を実施したところ、低酸素応答や解糖系がエンリッチした(図3下)。また、高精度に転写因子を予測できるレギュロンデータベースを用いて解析したところ、低酸素応答の制御転写因子である HIF1A がヒットしたことから、低酸素応答の関与が示唆された。

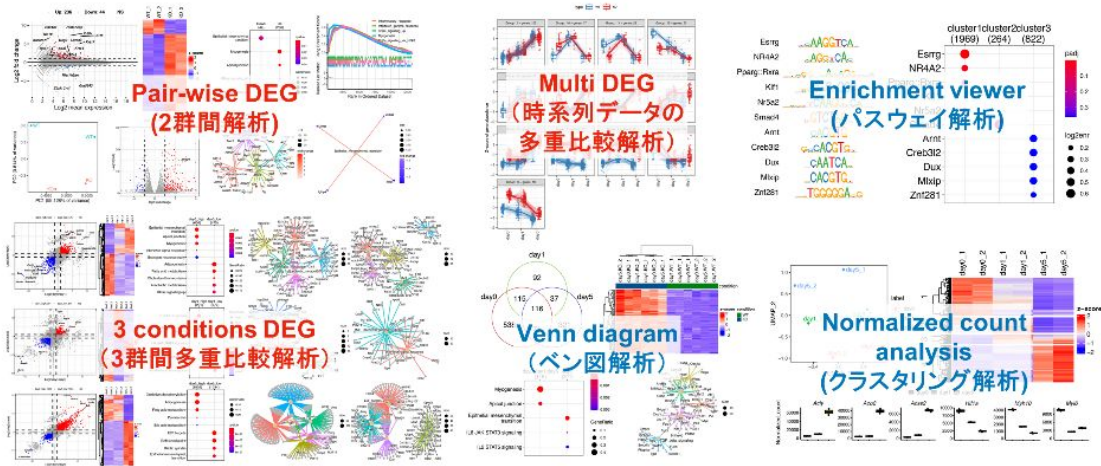


図 2. RNaseqChef

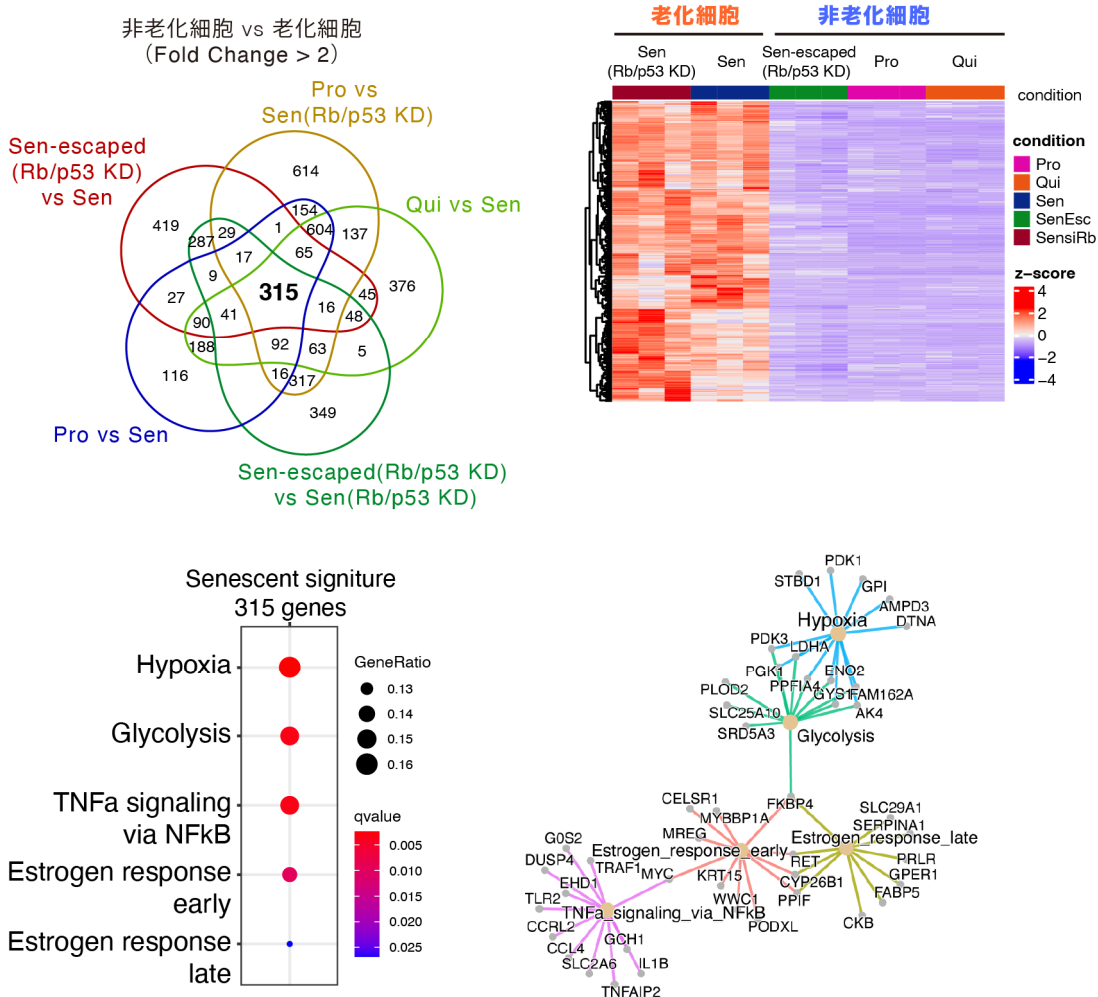


図 3. 老化細胞に特徴的な発現遺伝子の解析

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 3件）

1. 著者名 Igata Tomoka, Tanaka Hiroshi, Etoh Kan, Hong Seonghyeon, Tani Naoki, Koga Tomoaki, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Loss of the transcription repressor ZHX3 induces senescence-associated gene expression and mitochondrial-nucleolar activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262488	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 Tanaka Hiroshi, Igata Tomoka, Etoh Kan, Koga Tomoaki, Takebayashi Shin ichiro, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 The NSD2/WHSC1/MMSET methyltransferase prevents cellular senescence associated epigenomic remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/accel.13173	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 Etoh Kan, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 A web-based integrative transcriptome analysis, RNAseqChef, uncovers cell/tissue type-dependent action of sulforaphane	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104810 ~ 104810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104810	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 衛藤貴, 中尾光善
2. 発表標題 RNAseqChef: 遺伝子発現変動を自動的に可視化するRNA-seq統合解析ツール
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衛藤貴, 中尾光善
2. 発表標題 RNAseqChef: 遺伝子発現変動を自動的に可視化する RNA-seq統合解析ツール
3. 学会等名 トーゴの日シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衛藤貴, 中尾光善
2. 発表標題 遺伝子発現変動を自動的に可視化するRNA-seq統合解析ツールの開発
3. 学会等名 第15回エピジェネティクス研究会年会
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

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