

令和元年6月12日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H01833

研究課題名(和文) 運動・ストレス・老化に関する新規バイオマーカーの開発と機能解析

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers on exercise, stress and aging and their functional analyses

研究代表者

鈴木 克彦 (Suzuki, Katsuhiko)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号：80344597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：老化マウスモデルと若齢マウス、早老マウスモデル、そして一過性運動モデルマウスと持久性運動モデルマウスにおいて、次世代シーケンサーを活用して網羅的mRNA発現解析と網羅的翻訳動態解析であるリボソームプロファイリングを行った。これらの解析により得られた変動因子について、リアルタイムPCRとウェスタンブロット法により転写産物とタンパク質量変化をそれぞれ検討した。さらに、骨格筋におけるシステムレベルでのネットワーク変化を捉えるために、共発現遺伝子ネットワーク解析を行い、興味深い遺伝子の新機能の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動や身体活動を担う骨格筋は総重量が生体の約50%にも達し、骨格筋で転写される骨格筋由来の分子は他の組織由来の分子に比べ多量に存在すると考えられる。老化モデルマウスや運動負荷マウスの骨格筋で網羅的に解析されてリストアップされた遺伝子は生活習慣病や老化の予防に役立つ可能性が高く、本研究ではバイオインフォマティクス的手法を用いて基礎研究レベルでの解析が行われ、新知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using aging-model mice and young mice together with acute exercise model mice and endurance exercise model mice, global mRNA sequence and ribosome profiling were performed using next-generation sequencer. Changed variables and factors based on the analyses were further confirmed by real-time PCR and western blotting, and messages and proteins were quantified. In addition, gene network analyses were performed to capture changes at the system level of skeletal muscle, and found interesting genes and their potentially new functions.

研究分野：予防医学

キーワード：翻訳動態 リボソームプロファイリング 運動 骨格筋 老化 遺伝子ネットワーク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らの過去の基盤研究(A)の成果として、網羅的に microRNA (miRNA) の発現変動を評価し、次世代シーケンサーを用いて messenger RNA (mRNA) の翻訳に着目した翻訳動態を網羅的に解析可能なリボソームプロファイリングを立ち上げた。それにより、これまで未知であった翻訳動態の解析や、新規バイオマーカーの開発のみならず、研究体制としてその機能評価と臨床応用も検討可能となった。

miRNA は、特定の mRNA の主に 3'非翻訳領域に対する部分的相補性を介して mRNA からタンパク質への翻訳を抑制する。興味深いことに、miRNA はエクソソームと呼ばれる小胞や RNA 結合タンパク質複合体に内包されて細胞外へ分泌され、周辺に存在する細胞や血流を介して遠隔の細胞に移動し、標的細胞の遺伝子発現を制御することが分かった。すなわち、miRNA はホルモンやサイトカインと同様に細胞間情報伝達を担い、特定の組織において転写された miRNA が、組織液あるいは血液を介して他の組織において遺伝子発現を制御している可能性が考えられる。

運動や身体活動を担う骨格筋は総重量が生体の約 50%にも達し、骨格筋で転写される miRNA を総量としてみた場合、骨格筋由来の分子は他の組織由来の分子に比べ多量に存在すると考えられる。実際に、ヒト血中分泌型 miRNA のプロファイリングをレジスタンス運動前後で比較したところ、骨格筋において発現している複数の miRNA が検出された(Wadaら *JBC* 2011、Sawadaら *PLoS One* 2013)。また、運動誘発性炎症モデルをマウスに適用したところ、いくつかの miRNA の発現動態が血中、骨格筋、肝臓等の実質臓器で異なっていた。以上より、特定の組織で転写された miRNA が、単なる拡散によって組織液あるいは血液に移動するのではなく、何らかの選択的な調節機序により複数の臓器が miRNA ネットワークを形成していると想定されるが、これもバイオインフォマティクス的手法を用いて統合する必要がある。

### 2. 研究の目的

システムレベルにおける恒常性維持や、運動・老化などの生理的变化に伴うネットワークレベルの作用機序を解明するには、個々の遺伝子の発現変動解析に加え、遺伝子ネットワーク総体として解析する必要がある。遺伝子ネットワークに焦点をおいた解析により、個々の遺伝子の発現変動解析では看過されてきたシステムレベルでの細胞内応答を検討することができる。個々の遺伝子単位では発現量変化が小さい場合でも、ある特定の機能を司るネットワークにそれらの小さな変化が集積した場合、ネットワーク総体では結果として大きな変化に繋がると考えられる。

### 3. 研究の方法

老化マウスモデル(24ヶ月齢)と若齢マウス(20週齢)、早老マウスモデルである SAMP8 (12ヶ月齢と19週齢)、そして一過性運動モデルマウスと持久性運動モデルマウスにおいて、次世代シーケンサーを活用して網羅的 mRNA 発現解析(mRNA-Seq)と網羅的翻訳動態解析であるリボソームプロファイリングを行った。mRNA-Seq の発現データとリボソームプロファイリングのデータを照合させることで、従来の網羅的解析法では見過ごされていた mRNA 変動非依存的であり翻訳調節依存的に変動する新規因子を検出できる。これらの解析により得られた変動因子について、リアルタイム PCR とウェスタンブロット法により転写産物とタンパク質量変化をそれぞれ検討した。さらに共発現遺伝子ネットワーク解析により、個々の遺伝子発現量変化では捉えきれないネットワークレベルの変化を解析した。同一ネットワークに帰属する遺伝子は、相互作用し共通の生理機能を担うことが多い。老化や運動変化と強く相関するネットワークに着目し、そのネットワークの中でも特にこれまで機能が分かっていた遺伝子を候補遺伝子とした。培養細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて候補遺伝子をノックアウトし、共発現遺伝子ネットワーク解析に基づく機能評価を行った。さらに、リボソームプロファイリングのデータに対し、独自に開発した解析手法を適応することで、運動前後におけるリボソームの動態を詳細に解析することで、翻訳速度が変化している遺伝子やその原因因子も特定した。

### 4. 研究成果

マウス運動モデル、早老マウスモデルである SAMP8 の骨格筋サンプルを用いて、転写・翻訳動態における網羅的解析を行った。さらに、骨格筋におけるシステムレベルでのネットワーク変化を捉えるために、共発現遺伝子ネットワーク解析を行い、興味深い遺伝子の新機能の可能性を見出した。

共発現遺伝子ネットワーク解析では、同一のネットワーク内の遺伝子群は似たような機能を有していることが多い。そのため、機能未知であった遺伝子も近傍の既知遺伝子の機能からその働きを推測することができる。転写・翻訳動態データを用いて共発現遺伝子ネットワーク解析を行ったところ、翻訳動態特異的な(転写動態では見られない遺伝子間の)ネットワークを見出した。そのうちの一つには、リボソーム複合体や翻訳に関わる遺伝子がエンリッチされていた。このネットワークを詳細に検討したところ、これまでリボソームや翻訳とは全く関係性が認められていない遺伝子(候補遺伝子)も当該ネットワークに存在していた。前述の通り、共発現遺伝子ネットワークでは類似した機能を有する遺伝子が同一ネットワーク内に存在する傾向が強いため、遺伝子は翻訳を調節している新因子である可能性が示唆された。

そこで候補遺伝子の翻訳に関する機能を検証するために、培養細胞において候補遺伝子をノックダウンさせ、候補遺伝子の細胞増殖や翻訳動態への影響を検証した。その結果、候補遺伝子のノックダウンによって、細胞の増殖が著しく停滞することに加え、細胞内のグローバルなタンパク質産生量も顕著な減少を示した。

リボソームプロファイリングによりリボソームの密度分布を解析することで、各遺伝子における翻訳速度を間接的に定量することができる。しかし、遺伝子配列や高発現遺伝子由来のノイズが高精度での解析を困難にしている。我々は、新たな解析手法を開発することで、これらのノイズを最小限に抑えることに成功した。同手法により、運動前後における各遺伝子や各コドンの翻訳速度を検証した結果、顕著な翻訳速度の変化は認められなかった。同様の手法を応用し、運動非依存的に mRNA 上で局所的に翻訳速度に影響を及ぼしている因子を探索するため、既知の mRNA 結合因子やその結合配列をマイニングした。その結果、ある因子の結合部位における上流と下流のリボソーム密度を比較したところ、結合エネルギー依存的にリボソーム密度が変化していた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hiroaki Sako, Katsuhiko Suzuki, Genome-wide analysis of acute inflammatory and anti-inflammatory responses in RAW264 cells suggests cis-Elements associated with translational regulation, *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 7(2), 191, 2016.

Hiroaki Sako, Koichi Yada, Katsuhiko Suzuki, Genome-wide analysis of acute endurance exercise-induced translational regulation in mouse skeletal muscle, *PLoS One*, 11(2), e0148311, 2016.

〔学会発表〕(計 6 件)

佐古博皓, 鈴木克彦, 第 70 回日本体力医学会大会, 一過性運動や急性炎症刺激にともなう翻訳速度変化の解析, 和歌山, 2015. 9.

Hiroaki Sako, Katsuhiko Suzuki, EMBO Conference Protein Synthesis and Translational Control, Identifying conserved hotspots of inflammatory stimulus-induced dynamics in translation speed within ribosomal exit tunnel at a single residue resolution, Heidelberg, Germany, 2015. 9.

佐古博皓, 鈴木克彦, 翻訳速度変化に起因するタンパク質の構造・機能変化の可能性. ストレス応答制御に基づく次世代型健康寿命科学の研究拠点形成第四回成果報告会, 東京, 2016. 3.

佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦, 第 72 回日本体力医学会, 翻訳動態特異的共発現ネットワークによる遺伝子の機能予測とその解析, 松山, 2017. 9.

Hiroaki Sako, Takayuki Akimoto, Katsuhiko Suzuki: MIRAI seminar and Ageing workshops, Translation-specific gene network predicts novel gene functions, ルンド, スウェーデン, 2017. 10.

佐古博皓, 秋本崇之, 鈴木克彦, 翻訳動態特異的な共発現遺伝子ネットワーク解析, 日本筋学会第四回学術集会, 2018. 8.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 秋本崇之

ローマ字氏名: AKIMOTO Takayuk

所属研究機関名: 早稲田大学

部局名：スポーツ科学学院  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：00323460

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。