

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19277

研究課題名（和文）加齢で誘導される概日振動のエピジェネティック制御とその適応的意義の解明

研究課題名（英文）Epigenetic control of age-induced circadian oscillations and its adaptive effects on fitness

研究代表者

松本 顕（Matsumoto, Akira）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40229539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ショウジョウバエ脳内で加齢すると明瞭に概日振動を示し始める late-life cyclus の発現機序の解明を試みた。まず、若齢群と老齢群のゲノム修飾変化を ATAC-seq で解析した。また、若齢と老齢の遺伝子発現プロファイルのクラスタリング、上流解析、KEGG 解析を行った。これらを総合し、加齢によりゲノム修飾が変化し、老齢になると高発現が誘導される、ある GATA 因子を late-life cyclus のマスター遺伝子候補として同定した。また、これに関連した 2 つの転写因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ショウジョウバエ脳内で生じているゲノム修飾の昼夜変動を、若齢群と老齢群で比較した世界初の事例と思われる。加齢に伴うゲノム修飾の変化には注目が集まっているが、脳にターゲットを絞った点や昼夜変動のデータを取得している点において学術的な新規性がある。また、本研究の社会的意義としては、酸化ストレスや栄養条件がゲノム修飾などを介して新たな遺伝子発現様式を誘導する可能性を示した点でアンチエイジング創薬へのヒントの一助となり得る。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this study is to elucidate the expression mechanism of the late-life cyclus, which begins to show a clear circadian oscillation with aging in the *Drosophila* brain. First, we analyzed changes of genome modification by aging using ATAC-seq analysis. We also performed bioinformatic analyses, clustering, upstream analysis, and KEGG analysis, of gene expression profiles in young and old flies. In conclusion, we identified one GATA factor, whose expression is induced with age, as one of candidates of the master genes for late-life cyclus, as well as two transcription factors related to the GATA factor.

研究分野：時間生物学

キーワード：ショウジョウバエ 時計遺伝子 老化 エピジェネティクス 発現制御

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

概日振動を生み出す分子メカニズムの解明は一段落し、2017年にはノーベル賞も授与された。現在は、光周性・食餌リズム・睡眠との関連など、その適応的意義の解明に向けた研究が盛んになっている。申請者らも睡眠との関連課題でH28～31年度に科研費の助成を受け、加齢に伴ってショウジョウバエ脳内で発現量や発現リズムの変化する遺伝子群を網羅的に探索した。その過程で思いがけず、数百個におよぶ late-life cycler の同定に到った。late-life cycler は、加齢が進行してから高発現を開始し、明瞭に概日振動を示し始めるという、一見は直感に反した発現様式を示す。これまで未同定の概日時計関連遺伝子群であるが、概日リズムが老化とどのように関係しているかを解明するための恰好の研究対象と思われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、late-life cycler の発現機序と適応的意義について、エピジェネティックなゲノム修飾の観点から解明することであった。本研究課題を申請した時点では「周期的な遺伝子発現を加齢に伴って調節するマスター遺伝子」が存在することを仮定し、その同定を目指す計画とした。マスター遺伝子の機能としては、クロマチン修飾に影響を与える因子を想定し、当該遺伝子の加齢に伴う発現誘導メカニズムを探るとともに、下流遺伝子の同定を行うことで、その適応的意義を解明する計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) ATAC-seq によるゲノム修飾領域の同定

上記の目的を達成するために、2方向からのアプローチを行った。ひとつは、若齢群(羽化後1週齢)と老齢群(同10週齢。この時点でのオスの生存率は約20%)について、直接的にゲノム修飾領域の比較を行う方策である。このために、ゲノムの修飾部位を網羅的に同定できる ATAC-seq を採用した。

研究に着手した時点では、ショウジョウバエの脳を対象とした ATAC-seq の解析事例はなかった。そこで予備実験として、1～2週齢のオス12匹および60匹を解剖して得た脳サンプルを用いて ATAC-seq を行った。結果を比較したところ、12匹で必要十分との結論が得られた。

そこで、LD12:12の光条件に同調させた1週齢の若齢オスと10週齢の老齢オスについて、明期開始から、1、7、13、20時間後のタイミングで、1日4回、それぞれ12匹ずつ解剖して脳をサンプリングした。サンプリングは独立に2系列行った。合計16サンプルについて、ATAC-seq 解析をアクティブ・モティブ社に業務委託した。次世代シーケンスの平均リード数は1億リードであった。

得られた結果に基づき、昼夜でゲノム修飾が変化する領域、および、同じ時間帯でも加齢に伴ってゲノム修飾の変化する領域をバイオインフォ解析により同定した。さらに、染色体上にこれらの領域をマッピングし、ゲノム修飾の影響を受けるとされる遺伝子群を網羅的に同定した。

(2) RNAseq による遺伝子プロファイルのバイオインフォ解析

① 若齢群/老齢群単独でのクラスタ分析

2つめのアプローチは、若齢群と老齢群の脳をサンプルとした、RNAseq 結果のバイオインフォマテックス解析で、late-life cycler 遺伝子群の転写調節領域に存在するコンセンサス配列の探索と関連因子の推定を目指した。このために、まずは若齢群および老齢群別に、周期発現のあった遺伝子群の発現プロファイルのクラスタリングを行った。つまり、数百個の遺伝子群を発現パターンでグループ分けしたことになる。なお、クラスタ解析は、セルイノベーター社に業務委託した。

② UMAP 解析

これと並行して、若齢群と老齢群の発現プロファイルを遺伝子毎に連結した一連の時系列を作成し、機械学習によるクラスタリングも試みた。クラスタリングには UMAP 解析 (Uniform Manifold Approximation and Projection) を用いた。この一連の解析では、加齢変化に着目して、遺伝子の発現パターンや発現強度の分類を行ったことになる。なお、UMAP 解析についてもセルイノベーター社に分析依頼し、作業の効率化をはかった。

(3) 総合考察

上記(1)の ATAC-seq から同定された遺伝子群を、(2)の RNAseq のバイオインフォ解析結果と照合することで、加齢が進行してから高発現を開始し、明瞭に概日振動を示し始めるという発現機序について考察した。さらに、上記(2)の①、②のクラスタ分析結果に基づき、同一クラスタにグループ化された遺伝子群毎に、転写調節領域のコンセンサス配列を i-cis Target 法 (Imrichová et al., Nucleic Acids Res, 2015) によって同定し、コンセンサス配列に結合する転写因子を推定する上流解析を行った (<https://gbiomed.kuleuven.be/apps/lcb/i-cisTarget/>; データベース ver.4 を使用)。さらに、late-life cycler 遺伝子群の適応的意義を考察するために、クラスタ毎に KEGG 解析 (https://www.genome.jp/kegg/kegg_ja.html) を実施し、各クラスタに enrich された遺伝子機能を抽出した。

4. 研究成果

(1) ATAC-seq によるゲノム修飾領域の同定

研究方法の欄にも記載した通り、オス 12 匹の脳で ATAC-seq が実施可能であることを予備実験から明らかにできた。そこで、LD12:12 の光条件に同調させた 1 週齢の若齢オスと 10 週齢の老齢オスについて、6 時間ごとに 1 日 4 点、それぞれ 12 匹ずつ解剖して脳をサンプリングし、次世代シーケンスを行った。duplication サンプル間での相関係数は 0.996 以上できわめて高く、再現性よく実験が行われていることが示唆された。

① 昼夜でのゲノム修飾変動

まずは、同じ週齢のサンプル群内において、昼夜でクロマチン構造が変化している領域をバイオインフォ解析で探索した。ゲノム修飾に概日変動がみられた領域は数か所しか見つからなかったものの、これらの領域には、vri や cwo といったコアとなる時計遺伝子が含まれていた。

ショウジョウバエの脳内の概日ペースメーカー細胞は多く見積もっても 150 個ほどで、圧倒的多数の脳細胞では時計遺伝子であっても周期的な発現はない。よって、ペースメーカーニューロンのみをサンプリングして single cell ATAC-seq を実施すれば、他の時計遺伝子も含めて、もっと多くの領域にゲノム修飾の周期変動が同定される可能性はある。本研究では実施期間や予算の制約から single cell ATAC-seq は実施できず、より厳密な解析は将来への課題となったが、少なくとも vri と cwo の発現機序にゲノム修飾が関与する可能性が示されたことは興味深い。

② 加齢に伴うゲノム修飾変化

続いて、若齢群と老齢群を比較することで、加齢によるゲノム修飾変化が見られる領域をバイオインフォ探索した。サンプリング位相に拘らず、若齢群と老齢群で変化のあった領域をリストアップすると、加齢によって修飾が増えた領域は 3708 箇所、減った領域が 3909 箇所あった。

次に、サンプリング位相毎に加齢によるゲノム修飾に変化がみられた領域について解析した。加齢によって修飾が増えた領域は 4 つの位相の平均で 2478 箇所、減った領域は 2226 箇所あった。以上の結果は、加齢によりオス脳内でのクロマチン修飾に明瞭な変化が生じていることを強く示唆している。

同定された領域をゲノムにマッピングすることで、クロマチン修飾の影響を受ける可能性のある遺伝子を抽出した。1476 個の遺伝子群が同定され、この中には、per, vri, Pdp1, cwo といったコアとなる時計遺伝子が含まれていた。一方で、RNAseq の結果からは、vri を除いて時計遺伝子の発現レベルは若齢と老齢で変化しないことが示されている。また、ゲノム修飾が変化した遺伝子群は early-もしくは late-life cycluser のごく一部でしかない。より厳密な議論には single cell ATAC-seq が必要だが、加齢に伴うゲノム修飾変化は、必ずしも発現量や発現プロファイルの変化の原因にならない可能性が浮上した。これに伴い「late-life cycluser のマスター遺伝子はクロマチン修飾に影響を与える因子である」という初期の仮説はいったん保留せざるを得なくなった。

(2) RNAseq による遺伝子プロファイルのバイオインフォ解析

① 若齢群/老齢群単独でのクラスタ分析

若齢群または老齢群に関して、周期発現のあった遺伝子群の発現プロファイルをクラスタ解析すると、どちらも 8 クラスタに分類できた。クラスタ毎のヒートマップを見てみると、8 つのクラスタは、発現のピーク位相による分類とほぼ一致していた。

続いて、8 つのクラスタ毎に転写調節領域のコンセンサス配列を i-cisTarget 解析で同定し、それに結合する転写因子を推定した。若齢群または老齢群に特異的な転写因子が 7 つ同定され、4 つは GATA 因子ファミリーに属していた。この中には、自身も加齢によって高発現をはじめた転写因子が含まれており、本研究で仮定していた「late-life cycluser のマスター遺伝子」候補である可能性が考えられた。ただし、この時点では、この因子自身に対する発現誘導メカニズムは未知であり、またクロマチン修飾との関連性も未解明であったため、作業仮説を「late-life cycluser 遺伝子群の発現レベルは多段階カスケードで調節される」と修正して後の研究を進めた。

② UMAP 解析

老弱問わず、オス脳内で発現に周期性の見られた 3963 個の遺伝子を対象に、若齢群と老齢群の発現プロファイルを一連の時系列として機械学習させて、加齢に伴う発現パターン変化の類似性に着目したクラスタリングを UMAP 解析により行った。

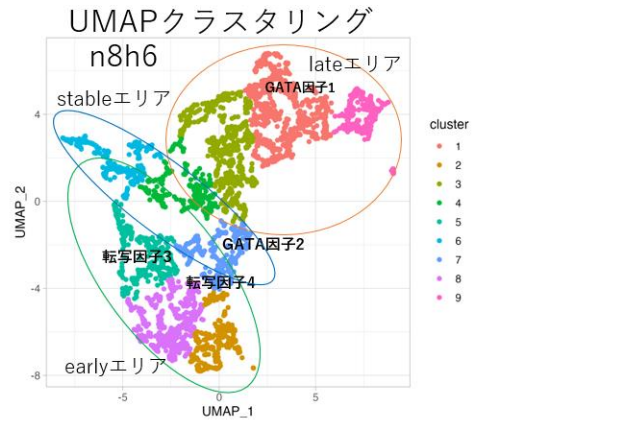
まずは、分類のパラメーターセットを振り分けて、42 種類のクラスタリング結果を得た。しかし、これらは機械学習によるクラスタリングのため、どういう類似性に着目した分類かが人間には理解し難いものも多数あった。そこで、この中から、分類が妥当と思われる 4 つのクラスタリング結果を選別し、KEGG 解析や上流解析を行った。

4 つのクラスタリング結果のうち 3 つは 3963 個の周期発現遺伝子群を 9~12 個に、残る 1 例は 36 個のクラスタに分類するものであった。それぞれのクラスタについて発現プロファイルのヒートマップを見てみると、上記①とは異なり、発現のピーク位相に着目した分類ではなく、late-life cycluser と early-life cycluser が明瞭にエリア分けされる共通性があり、異なるのは、例えば、late-life cycluser を何クラスタに細分化しているかであった。そこで、4 つの中で中間的な分類になっている n8h6 と名付けたクラスタリング結果を選び（次頁図）、以下の総合考察を行った。

(3) 総合考察

① late-life cyclers の発現機序

ATAC-seq によりクロマチン修飾変化が検出された 1476 遺伝子を n8h6 クラスタリングにマップした。遺伝子発現に周期性を示すものは 406 個で、early-life cyclers には 196 個、late-life cyclers には 149 個、加齢によらず安定に周期性を示す stable cyclers には 61 個がマップされた。early エリア(緑楕円)ではクラスタ 5,8 に、late (青楕円)ではクラスタ 1,3 に、stable (茶色楕円)ではクラスタ 3,4 に集中してマップされていたものの、どれもクラスタを構成する遺伝子群の約 3% を占めるのみであった。よって、UMAP 解析からも、加齢に伴う周期発現変化へのクロマチン修飾の影響についての一般論を導くことは難しかった。ただし、上述したようにペースメーカー細胞に関する single cell ATAC-seq の実施によって状況が変化している可能性がある。



i-cisTarget による上流解析の結果から、n8h6 クラスタリングの 9 つのクラスタの半数以上に共通して影響を与えると思われる転写因子が同定された。それらは 2 種の GATA 因子で、このうちの 1 つ (仮に GATA 因子 1 と呼ぶ) は、上述の研究成果(2)①でも着目した late-life cyclers マスター遺伝子候補であった。GATA 因子 1 はクラスタ 1 に属し、加齢に伴うクロマチン修飾変化も被ることが ATAC-seq で示されていた。もうひとつの GATA 因子 2 はクラスタ 7 に分類される stable cyclers で、加齢に伴うクロマチン修飾変化は検出されなかった。

GATA 因子とは別の転写因子 (転写因子 3) も同定され、クラスタ 5 に属する early-life cyclers であった。加齢によるクロマチン修飾変化は検出されなかったものの、老齢になると構造的に高レベル発現するようになり、結果的に周期性は失われていた。

先行研究から、転写因子 3 は別の転写因子 (転写因子 4) と結合して酸化ストレス反応に関与する遺伝子群を活性化することが知られていた。そこで、転写因子 4 に関して我々のデータを調べてみると、クラスタ 7 に分類される early-life cyclers であった。ただし、転写因子 4 の発現量は加齢に関わらず一定している。また、興味深いことに、転写因子 3 は前述の GATA 因子 1 (late-life cyclers マスター遺伝子候補) とも相互作用することが別の先行研究から判明していた。

② KEGG による機能解析

n8h6 クラスタリングに対して、それぞれのクラスタ毎の KEGG 解析を行った。early-life cyclers が集中するクラスタ 2,5,7,8 と late-life cyclers が集中するクラスタ 3,9 には、それぞれ特徴的な機能をもつ遺伝子が enrich されていた。前者にはタンパク質代謝関連因子が多く、しかも、分解系因子が多く含まれていた。後者は、核酸も含めた糖代謝関連因子を多く含み、生合成関連因子や酸化ストレス関連因子が目立った。late クラスタ群に酸化ストレス関連因子が多く含まれていることは、老齢期に転写因子 3 が高発現していることから説明可能かもしれない。

③ まとめ

以上の結果を総合して、少なくとも一部の late-life cyclers の発現機序は、以下のようなカスケードの制御によって成立するものと推測した。

若齢期は代謝が活発で、タンパク質やアミノ酸の代謝/分解活性も高いが、老齢になるとそれらの代謝は落ち、また酸化ストレスの蓄積も増える。この体内環境の変化が、転写因子 3 の高発現を誘導し、転写因子 4 との相互作用によって酸化ストレス関連遺伝子が活性化される。

一方で、GATA 因子 1 は潜在的には時計遺伝子による転写制御も受けるが、若齢期には発現量が少なく周期性は明瞭ではない。老齢では、さまざまな環境ストレスからクロマチン修飾変化が生じて GATA 因子 1 の発現レベルが上昇し、周期的な変動が明瞭になる。発現した GATA 因子 1 は転写因子 3 と周期的に相互作用する。転写因子 3 は転写因子 4 と結合して酸化ストレス関連遺伝子の発現を誘導しているが、周期的に GATA 因子 1 による干渉を受けるために、下流の酸化ストレス関連遺伝子の発現にも周期性が生じ、これらは late-life cyclers に分類される。

一方で、GATA 因子 1 は独自のカスケード経路を通じて多くの下流遺伝子の発現を誘導する。その中には糖代謝関連遺伝子も含まれており、これらの遺伝子群も late-life cyclers 的に周期発現するようになる。糖代謝関連遺伝子群の同期的な活性化は、老齢になって低下した代謝レベルを補償し、これが late-life cyclers の適応的意義のひとつではないかと考えられる。

以上の検証には、遺伝子組換えシステムを用いた実験が不可欠である。しかし、同定した遺伝子群は発生や生存に不可欠で、人為的な発現量変更は致死を招く。本研究ではこれを回避する予備実験にも取り組んだが、実施期間中には解決できず、検証実験は今後の課題として残された。

また、上記のメカニズムだけでは全ての late-life cyclers の発現機序や適応的意義を説明し尽くしているとは言い難い。それらの解明も今後の課題として残っている。

本研究成果の医療への即座の応用は難しいが、将来的には、代謝やクロマチン修飾など加齢に伴う体内環境変化に反応して作用する抗老化薬などの開発に資する可能性があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本顕
2. 発表標題 昆虫におけるオスとメスの時間生物学
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Shigenaga, Taichi Q Itoh, Akira Matsumoto
2. 発表標題 “Why do females live longer than males?” Search for the responsible genes in Drosophila brain.
3. 学会等名 4th Congress, International Academy of Sportology（国際学会）
4. 発表年 2024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
研究分担者	伊藤 太一 (Itoh Taichi) (20769765)	九州大学・基幹教育院・准教授 (17102)	
研究分担者	松本 綾子 (Matsumoto Ayako) (20833825)	順天堂大学・大学院スポーツ健康科学研究科・特任助教 (32620)	

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
---------	---------