

# 研究終了報告書

## 「老化ダイナミクスを駆動する遺伝子カスケードの同定」

研究期間： 2022年10月～2023年8月

研究者： 廣木 進吾

### 1. 研究のねらい

ヒトを含めたほとんどの動物は、発達や性成熟後においても時間経過すなわち加齢に伴い生理状態が変化する(老化)。老化現象の全貌を理解することは医学的にも重要であるが、生命現象を理解するという観点からいえば理学的側面からも極めて重要な課題である。

過去の様々な研究によって、高齢の個体において生理状態や構造が若齢の生物と比べどのように機能変化しているかという点は詳細に記述されてきた。一方で、動物は死へ至るまでの生活史において典型的な生理状態変化の時間パターンをたどることから、老化とは加齢に伴った生理状態の時間的遷移、すなわちダイナミクスの側面も持つ。実際、こうした側面は世界的に認識されている。特に最近、寿命が約2-3年のマウスから時間9点(3か月ごと)のトランスクリプトームを記述し、遺伝子発現の時間発展パターンを特徴づけた論文が発表され、老化研究の領域でも大きく注目されている。(Schaum et al., 2020 *Nature*)。

しかしながら、このように大規模な研究を踏まえてさえ、その遷移過程がどのようにして形作られているかは未だ不明である。本研究では、その大きな理由の一つとして時間解像度の不足に着目する。先に挙げた研究は大規模ではあるが、3か月/サンプルというものは極めて疎なサンプリングスケジュールであり、時間発展パターンの記述としては十分とは言えない。一方で、マウスにおいてその寿命である2-3年にわたって、複数個体でサンプリングを継続することについては、飼育コストや実験コストなどの現実的な問題が極めて大きい。そこで、本研究では、線虫 *C. elegans*(以下、線虫)をモデル動物として用い、動物一般的な老化ダイナミクスの機構解明を目指す。線虫は寿命が12日程度であるため、生涯にわたり密にサンプリングを行っても負担が少ない。さらに、線虫は同一培養プレート中から2000-3000匹サンプリングすることが可能であるため、個体差を平均化することが容易である。このことから、線虫は老化ダイナミクスを記述するうえで最適なモデル動物の一つであるといえる。

本研究を遂行するにあたり老化ダイナミクスを駆動する機構の仮説として、発生や分化における遺伝子カスケードの概念に着想を得た。これらも多数の遺伝子発現が動的に変化する過程であるが、ここでは遺伝子の相互作用が連鎖的に下流の遺伝子の変化を引き起こし(=遺伝子カスケード)、最終的な遺伝子発現パターンのダイナミクスを形作ることが知られている。本研究は老化についても同様のメカニズムが存在するのではないかという仮説を出発点とした。

以上の背景より、本研究は、老化におけるダイナミクスとその生成メカニズムを解明する目的で線虫における高い時間解像度での老化プロセスの記述を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

老化のダイナミクスを理解するため、本研究では線虫 *C. elegans* の reproductive phase 終了後から平均寿命到達までの生活史にわたり、高時間解像度のトランスクリプトームデータを

取得した。これにより、加齢に伴うそれぞれの遺伝子における発現変動の詳細なダイナミクスが記述され、その時間発展は典型的ないくつかのパターンに分かれることを示した。多くの遺伝子が加齢により発現変動したにもかかわらず、その発現変動パターンに現れる時間差は小さく、遺伝子発現パターン間の高い同調性が見られた。これら典型的ダイナミクスの構成要素として、①異なる転写因子パラログの寄与②ncRNA による制御低下という要因が存在することを明らかにした。さらに、我々のデータと過去の single-cell RNA-seq データと組み合わせることで、加齢によって特定の細胞種がその他の細胞種に近づくことで、老化様の発現ダイナミクスが生み出されることが示唆された。以上から、本研究はこれまでよりもはるかに時間解像度の高い老化 RNA-seq データを提供するとともに、その解析によって実際に老化におけるダイナミクスとその形成メカニズムに新たな洞察を加えるものである。

## (2) 詳細

### 線虫の生活史にわたる高時間解像度データ取得

過去の知見を考慮し、reproductive phase(生殖期間)終了後から平均寿命到達までの線虫、すなわち成虫 4 日齢~12 日齢の線虫 1000 匹-3000 匹を高頻度にサンプリングし RNA-seq 解析を行うことで、高時間解像度のトランスクリプトームデータ(mRNA-seq 及び small RNA-seq)を取得した。

#### A. 可視化と DEG 解析:加齢に伴う遺伝子発現変化とその時間差

まず、加齢による遺伝子発現変動の概観を得るために、各遺伝子における最大発現量を 1 として正規化し、階層的クラスタリングおよびヒートマップにより可視化した。ヒートマップ中にはいくつかの典型時間発展パターンが見られたが、このように時間解像度の高いデータセットでさえ、多くの遺伝子が非常に同調性の高い形で変動することが明らかとなった。このことから、老化のダイナミクス形成において、多くの遺伝子が個別に制御されるというよりはむしろ、少数の背景要因が同調的に変化することで老化のダイナミクスが生み出されることが予想された。また、さらに加齢によって発現が変動する遺伝子(Differentially Expressed Genes, DEGs)を抽出した。その結果、過去の報告より多くの DEG を検出することができた。

#### B. 遺伝子発現の時間パターンを生み出すメカニズムの要因分解

##### B-1. 階層的クラスタリングによる典型的時間パターンの抽出及びエンリッチメント解析

さらに、それら DEGs における典型的ダイナミクスを、階層的クラスタリング及び任意距離での分割によって抽出した。DEG は最終的に 11 のクラスターに分類されたが、十分数の(50 以上の)遺伝子数を含むクラスターは高々 6 つであった。その内訳は加齢による低下パターンが 3 つ、上昇パターンが 2 つ、中期で一過的に発現上昇するものが 1 つであった。さらに、それらのダイナミクスに基づくクラスターについて、enrichment 解析を行った。これによって、線虫の老化時における時間パターンを生体機能変化と結びつけた。

**B-2. 転写因子パラログの異なる遺伝子発現パターン生成への寄与に関する解析**

次に、これら遺伝子発現のダイナミクスを形成する要因について調べるため、まず上流の転写因子に着目した。過去の報告と ChIP-seq データをもとに、時間パターンのクラスターごとに濃縮される転写因子を調べた。その結果、転写因子の近縁なパラログが異なる発現パターンを生み出すことに寄与しており、またその組み合わせによって新たな発現パターンが生み出されることが示唆された。

**B-3 small RNA の生み出す遺伝子発現パターンの抽出**

過去の研究から、老化によって様々な ncRNA の量的変化が起きることが知られており、遺伝子発現を制御する miRNA や piRNA の多くが加齢によって減少することが知られている(reviewed in Kim et al., 2019, *Mol. Cells*)。我々のデータにおいてもその傾向は再現され、さらに、特定の時間パターンが選択的にその変化の影響を受けることが明らかになった。

**B-4 老化 single cell RNA-seq データとの融合に基づく細胞間異質性の解析**

本研究で取得されたデータは高い時間解像度を持つ一方で、全身から RNA を抽出しているために、空間解像度を失っているという弱点もある。線虫は 1 細胞ごとに名前がついていることから、空間的情報を取り込むことは線虫を用いた老化研究において大きなメリットになるはずである。これらの要素を補完するため、我々は別の研究で 2-3 日おきに取得された single-cell RNA-seq データと組み合わせた。その結果、特定組織における老化は、特定の細胞タイプが加齢に伴って別の細胞タイプの転写発現状態に近づくことによることが示唆された。

**C. 遺伝子カスケード予測の為に GRN 推定及び相互作用データに基づくカスケード予測**

本研究のデータから遺伝子カスケードを推定するために、高い時間解像度とデータ点の数を利して、遺伝子ネットワーク構造(Gene Regulatory Network, GRN)推定を行った。さらに得られた GRN を有向グラフとみなすことで、ネットワーク解析によってカスケード上流の推定を行った。その結果、遺伝子カスケードの上流の因子候補となる転写因子を見出すことができた。この因子は哺乳類でも代謝にも関与する転写因子のホモログであり、動物一般的な寿命・老化の制御に関与する可能性がある。

**3. 今後の展開**

本研究における大きな科学的意義は、性成熟後の生活史全体にわたり高時間解像度の RNA-seq の記述を行った点にある。これによって、様々な遺伝子ごとに遺伝子発現変化の開始時点の差や変動パターンについて、正確に特徴づけることができた。特にダイナミクスの記述から、老化における①遺伝子間同調性と、②細胞間異質性の二点が同時に判明した。

①と今回発見した DEG に係る解析をさらに推し進めていくことで、老化ダイナミクスを駆動する新たな要因を発見できると考えられる。②に関してはさらに大きな波及が考えられる: 研究提案の時点から指摘を受け、また自分自身個人研究の限界として認識していたこととして、本研究から、高時空間解像度の老化記述の必要性や有用性を客観的に示すことができたといえ、大きな研究の流れに繋がらうものであるといえるだろう。

#### 4. 自己評価

##### 【達成度、研究の遂行プロセスに関して】

本研究は想定よりも速いスピードで進行した。その結果、当初想定していなかった老化ダイナミクスを生み出す多様な要因について言及することができた点は評価に値すると考えられる。一方で、海外への異動のため、実験条件や詳細の詰めに甘さが残り、特に RNA quality の低下や線虫の遺伝学的利点を生かしていない問題を解決していなかったという点は課題である。

総じて結果としてみれば、当初仮説とは異なる結論ながら、目的であった老化ダイナミクスの形成要因解明という領域において、研究開始から中止までの半年余りで一定の結論にたどり着くだけに足る研究結果を得ることができたことは、極めて早い段階において当初の研究目的を大枠で達成できたことを意味する。その意味で、本研究の達成度に関しては自分自身で評価している。

##### 【研究の遂行プロセス(管理体制)、研究費執行状況について】

必要研究費を当初予定より大幅にスリム化し、リソースデータをさらに増やすことができたという点は、本研究計画遂行における大きな評価点である。一方、研究の管理体制という面に関して、本研究は良くも悪くも担当者個人の中で完結していることが特徴的である。これは一元的な研究遂行を可能にし、迅速な研究振興につながった一方で、本人の負担がきわめて重くなった。また、所属機関内には線虫用の設備や株がほとんどなく、研究の方向性が解析に寄りすぎてしまったきらいもある。よって、ある程度まで個人で進める計画を立てたうえで、共同研究を早期から視野に入れるべきであったと考えられ、これは一つの反省点であるといえる。

##### 【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究により発見された老化ダイナミクスとその詳細な要因は、線虫というモデル動物上での知見ではあるが、老化という高齢化社会における最大の関心事項において大きな一歩を加えるものである。特に、高齢化社会においては寿命以上に健康寿命が重要視されており、老齢個体の生理状態のみならず、性成熟から死に至るすべての過程を見た本研究は、健康寿命の延長という観点に進展をもたらすだろう。

さらに、本研究は老化を生活史にわたるダイナミクスとみている。これは高齢者のみならず成人後の全ての年齢のヒトに係る知見であり、また地球上のほとんどの動物が老化とともに一生を終えることを踏まえると、広く動物の一生に係る理学的知見を深めるものであるといえるだろう。ただし、先に述べた通り、これはもちろん線虫における知見であることに留意する必要がある。今回の知見から、帰納的に動物普遍的な生物学的特性を探ることももちろんだが、個別の特性にも焦点を当てていくことも、生物における老化という現象を知るうえで極めて重要な観点であろう。

また、予備的ではあるが、特定転写因子の老化に対する関与については、哺乳類すなわちヒトへの応用可能性がある。哺乳類における検証を行うことができれば、抗老化薬の開発などの応用的成果に直接つながる可能性がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0 件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)