

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657122

研究課題名(和文) 老化細胞に蓄積するmadRNAの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of age-associated madRNA

研究代表者

飯田 哲史 (IIDA, Tetsushi)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：60391851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母の非対称分裂である“出芽”は、若い娘細胞と年を取った母細胞を生み出します。出芽に見られる娘細胞の若返りは、老化物質が母細胞に留まることで起こる可能性が考えられます。本研究では、老化がすすんだ母細胞にRNA分解酵素に耐性のあるRNAが特異的に蓄積していることを見出しました。また、本研究では遺伝学的な変異体解析を想定して、新型シーケンサーを用いて簡単に変異点を同定するWebツールの開発・公開も行いました。

研究成果の概要(英文)：Asymmetric cell division, "budding", produces a virgin daughter and an older mother. Rejuvenation of the daughter in budding may be from sequestration of aging factors into the mother. In this project, we found that ribonuclease-resistant RNAs are specifically accumulated into aged mother cell. For time-consuming process of genetic analysis, we also developed a web tool for mutation identification by next-generation sequencing.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA 老化 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

老化した細胞では、ミトコンドリアの異常、酸化タンパク質などの異常タンパク質の蓄積やゲノムの不安定化など、様々な異常が蓄積していることが知られています。出芽酵母の場合、細胞分裂を繰り返し老化が進んだ母細胞も出芽という非対称な細胞分裂により老化がリセットされた娘細胞を生み出すことから、機能異常になったミトコンドリアや環状に切り出されたリボゾーム遺伝子(ERC)などの老化因子が母細胞へ非対称に分配されることで細胞老化が進行しゲノムの不安定化などが起こると考えられています。しかし、近年 ERC の蓄積やミトコンドリアの機能に関係なく細胞老化が進行する事例も報告されており、未知の老化因子の存在が考えられます。

2. 研究の目的

(1) 「madRNA の精製法の確立と同定」

非対称な細胞分裂(出芽)で増殖する出芽酵母では、母細胞の老化進行と娘細胞の若返りが同時に起こることから、ゲノムの不安定化などを引き起こす未知の老化因子が母細胞へ非対称に分配や蓄積することによって、母細胞の老化が進行すると考えられます。これまでに、細胞老化の進行に伴い母細胞に特異的に分配・蓄積するものとして、リボゾーム RNA 遺伝子リピート領域から切出された環状 DNA が増幅し蓄積することが報告されていますが、RNA などの DNA 以外の核酸の蓄積は報告されていません。また、近年タンパク質に翻訳されないさまざまな RNA が細胞内で機能を持ち、細胞機能を制御していることが明らかとなってきたことから、本研究は、老化した酵母に特異的に蓄積する核酸として、DNA に加えて RNA 分解酵素(リボヌクレアーゼ)処理に耐性のある核酸の探索とその同定を目的としました。

(2) 「新型シーケンサーを用いた酵母遺伝学高速化ツールの開発」

機能性核酸分子など、機能が全くわからない因子にどのような機能があるかを解析する場合、酵母を用いた研究では、遺伝学的スクリーニングを用いて変異体を単離し、目的とする分子の周辺因子の同定や標的となる因子の機能解析を行います。しかし、さまざまな解析が高度にできる酵母においても、変異体を単離後、変異体の原因変異点の同定は非常に手間と時間が掛かり、研究の高速化を妨げる部分となっていました。本研究では、想定している機能未知の核酸の機能解析には、変異体を用いた高度な遺伝学的解析が必要となることから、酵母を用いた遺伝学的解析を新型シーケンサーによって高速化するツールの開発も目的としました。

3. 研究の方法

(1) 「madRNA の精製法の確立」

(1)-i: 娘細胞と段階的な老化細胞細胞調製法の確立

機能性核酸が老化細胞に特異的に蓄積することを示すためには、娘細胞から段階的に老化していく細胞を高純度で調製し核酸の調製をする必要があります。通常出芽酵母の培養液中には、さまざまな老化段階の細胞が混在しています。出芽酵母は、老化段階が進行するにつれて細胞の大きさが増していくことから、細胞の大きさを指標にエルトリエーターと呼ばれる円心分画装置により、最も小さい娘細胞から段階的に老化が進行した細胞を分画する方法を確立します。

(1)-ii: madRNA の精製法の確立

老化の段階で分画した細胞からゲノム DNA を調製する方法を改変して精製法を確立します。通常 DNA の精製法では、pH が 8.0 付近からそれ以上とすることで、RNA の分解を促しています。本研究では、RNA を想定して核酸の探索を行うため、RNA 調製にも耐えうる pH7.5 で核酸調製を行った後、一本鎖 RNA の分解を行うリボヌクレアーゼ A (RNaseA) を高濃度で長時間処理した後、残存している核酸で、老化細胞に特異的に蓄積しているものを精製します。また、異なるヌクレアーゼで処理することにより、madRNA の構造的特徴を明らかにします。

(2)-i: 酵母変異体の変異点同定のためのプール連鎖解析法の確立

新型シーケンサーを用いた解析では、全ゲノムサイズの数十倍(通常 20~30 倍)量の配列を解析します。したがって、戻し交配を行い四分子解析により連鎖解析を行った場合、変異型の表現型を示すクローンには、必ず原因変異点が存在しますが、他の突然変異は、ランダムか弱い連鎖によって、必ずしも変異型クローンには分離しません。したがって、変異型クローンを混ぜた後、シーケンス解析することにより、原因変異のみが 100%で変異型に濃縮される変異体プールをつくることができます。そこで、実際に変異型クローンを多数プールすることで、変異型クローン単独でシーケンス解析するよりも効率よく原因変異を絞り込めるかを検討します。

(2)-ii: 酵母変異体の変異点同定のためのバイオインフォマティクス解析法の確立

新型シーケンサーのデータ量は膨大であるため、高性能のコンピューターと解析ツール駆使して、変異点の抽出を行う必要があります。そこで、配列データのリファレンス配列へのマッピング、リファレンス配列との違いを抽出するフリーツールを用いた解析パイプラインの構築を行います。

(2)-iii: 酵母変異体の変異点同定を自動で行う Web ツールの構築

バイオインフォマティクス解析により抽

出された変異点は、リファレンス配列との違いであり、実際に解析に使用した細胞株における変異点とは必ずしも言えません。実際には親株の元々持っている変異点も抽出し、変異体の変異との差分を解析する必要があります。そこで、この煩雑な操作を簡単にするため、ワンクリックでパイプライン解析と差分解析が可能となるような Web ツールの開発を行います。

4. 研究成果

(1)-i: 娘細胞と段階的な老化細胞細胞調製法の確立

出芽酵母を一晩 30°C で培養した後、細胞周期を間期 G1 に α 因子で同調したのち、エルトリエーターにより細胞の大きさで、分離したところ、合成培地で培養した場合に非常にきれいに娘細胞から 10 回程度分裂し老化が進んだ細胞までを高い純度で分画することができるようになりました。また、栄養が豊富な培地である YPD 培地でも分離はきれいですが、細胞の大きさが全体的に大きくなるため、老化が高度に進行した細胞の濃縮は非効率的であることがわかりました。

(1)-ii: madRNA の精製法の確立

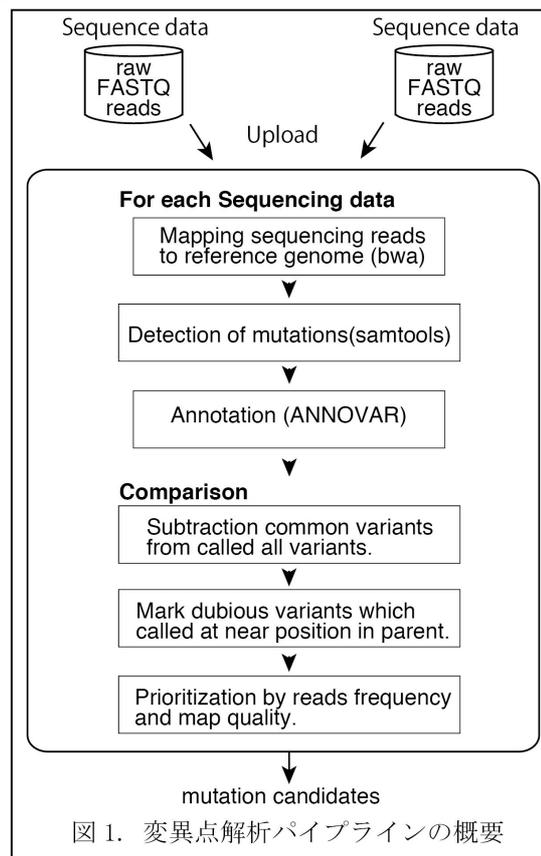
細胞の老化段階で分画した細胞から、核酸を調製し、2mg/ml の高濃度 RNaseA で処理してアガロースゲルで電気泳動したのちエチジウムブロミド染色することで、長さ 100 塩基前後の未知の短い二本鎖 RNA が大量に老化が進んだ母細胞に段階的に蓄積していることを見出しました。この核酸は、pH の高い (pH8.5) の核酸精製試薬で精製を試みると著しく減少すること、また 0.1N の NaOH で処理することで消失してしまうこともわかりました。さらに、アガロースゲルより精製後、熱変性した場合、RNaseA によって分解されること、変性前では、1 本鎖 RNA を分解する RNaseT によって分解されないことから、二本鎖 RNA であることがわかりました。熱変性後が不安定なため、同定のための配列決定実験を引き続き行っています。

(2)-i: 酵母変異体の変異点同定のためのプール連鎖解析法の確立

酵母のゲノムサイズは約 12Mbp (12 メガベースペア:1200 万塩基対)であり、もし仮にすべてのゲノム DNA に変異になってしまう仮想の場合でも統計的に変異解析できる変異型クローンのプール数は、 $2^n > 1200$ 万となる n 個です。したがって、24 個以上であれば、連鎖しない変異はほとんどプール中に 100%で濃縮されることはないことが明らかとなりました。高濃度の変異誘発剤処理により、実際に変異が 500 以上入っているものを対象に 24 個の変異クローンをプールして新型シーケンサーによる配列解析を行うことにより、優位な原因変異点候補を 1 つに絞り込むことができました。このことから、戻し交配をた

った一回だけでも、変異型クローンのプールする数を増やすことで、確実に原因変異点の同定が可能となることが明らかとなりました。

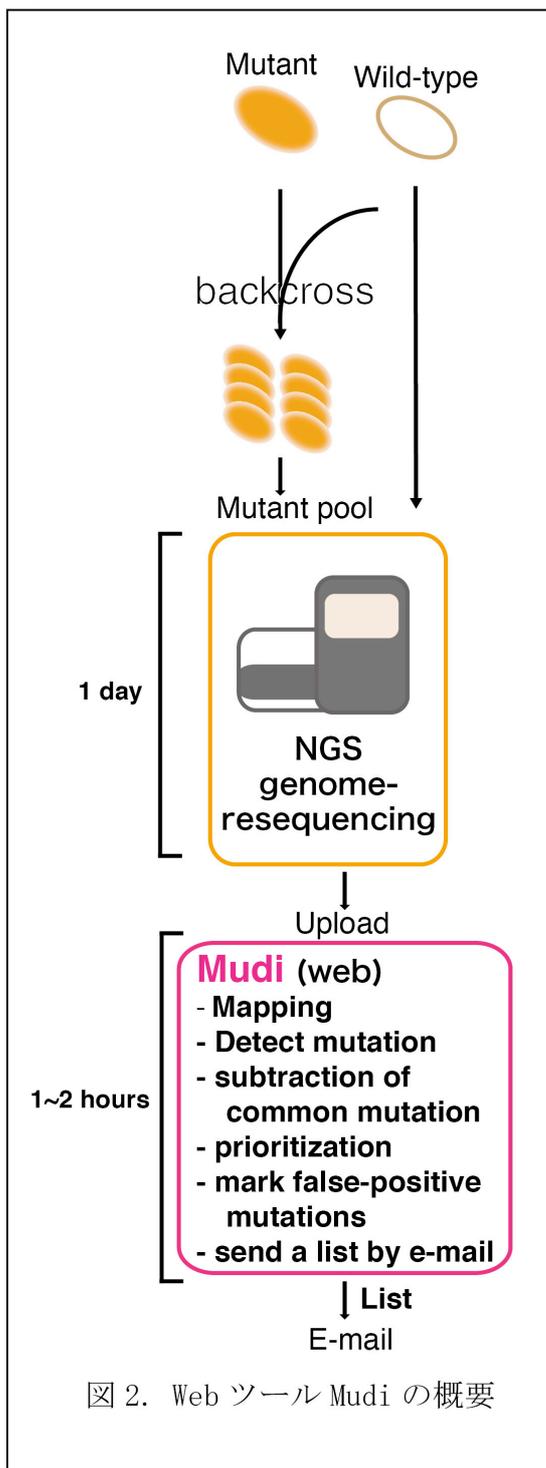
(2)-ii: 酵母変異体の変異点同定のためのバイオインフォマティクス解析法の確立
効率よく変異点と抽出するため、実績のある新世代シーケンサーデータ解析ツールを組み合わせパイプラインを構築しました。マッピングには BWA、変異の抽出には Samtools、アノテーションには ANNOVAR を用いました (図 1)。これにより確実に変異点の抽出ができるようになりました。



(2)-iii: 酵母変異体の変異点同定を自動で行う Web ツールの構築

既存のデータ解析ツールを用いた変異点の抽出法では、同じ塩基の欠質変異や挿入変異が異なる変異として報告されることを見出しました。これらの問題があると、実際には変異でないものを変異として高度に濃縮された変異候補として扱ってしまう恐れがあります。そこで、これら欠失・挿入変異が異なる変異としてコールされる場合、数塩基〜数十塩基ほど離れた変異としてコールされる傾向があることを明らかにし、これらの可能性があることをユーザー側に報告する項目として、近くの変異が親株でコールされているかの情報を変異候補リストに加えることができました。これにより、ほとんどのエラーとして抽出される変異を排除し、連鎖解析の傾向を確認できる変異点候補リスト

を作り出すことができようになりました(図1)。



以上の一連の変異点同定の過程を新型シーケンサーのデータを Web から送信し、ワンクリックで特的な変異点リストを mail で受け取ることができる Web ツールを公開運用しました (http://naoii.nig.ac.jp/mudi_top.html)。このツールの概要を図2に示します。Web ツールとプール連鎖解析法を組み合わせることで、従来の解析期間の10分の1程度の期間で大量の変異体の遺伝学的解析が可能となり、新しい遺伝学の進め方が可能となると期待されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

① Naoko Iida, Fumiaki Yamao, Yasukazu Nakamura, Tetsushi Iida., Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole-genome sequence., *Genes to Cells.*, 査読有、Vol.19、No.1、2014、pp.517-527
DOI: 10.1111/gtc.12151

② Hiroaki Kato, Kosuke Okazaki, Tetsushi Iida, Jun-ichi Nakayama, Yota Murakami, Takeshi Urano., Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3., *Scientific Reports.*, 査読有、Vol.3、2013、pp.2186
DOI: 10.1038/srep02186

③ Tetsushi Iida, Naoko Iida, Yasuhiro Tsutsui, Fumiaki Yamao, Takehiko Kobayashi., RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 査読有、Vol.427、2012、pp.143-147
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.027

〔学会発表〕(計 1 件)

① Tetsushi Iida, Naoko Iida, Yasuhiro Tsutsui, Fumiaki Yamao, Takehiko Kobayashi., Cell cycle regulation by RNAi components through RNA-export factor in fission yeast, 第35回日本分子生物学会年会 2012、12月11日-12月14日、マリンメッセ福岡・福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

Mudi: Mutation discovery in yeast
http://naoii.nig.ac.jp/mudi_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 哲史 (IIDA, Tetsushi)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号: 60391851