

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2023

課題番号：16K21158

研究課題名（和文）線虫を用いた記憶・学習を制御するノンコーディングRNAの解析

研究課題名（英文）Analysis of noncoding RNAs that regulate memory and learning using *C. elegans*

研究代表者

坂口 愛沙 (SAKAGUCHI, Aisa)

大阪大学・全学教育推進機構・助教

研究者番号：90608697

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ノンコーディングRNA（ncRNA）はタンパク質をコードしないRNAであり、多様な生理機能に関与すること、高等動物の記憶・学習などの神経活動においても制御の一端を担うことが明らかにされつつある。本研究では、シンプルな神経機能のモデルとして線虫*C. elegans*のドーパミン経路の変異体を用い、記憶・学習に関与するncRNAとその制御因子の探索を行い、高次神経機能における複雑な遺伝子発現制御機構の解明を目指した。その結果、野生型に比べドーパミン経路の変異体で発現が変化しているncRNAの候補を複数得られた。今後は、これらの候補ncRNAがどのように記憶・学習に関与するか、詳細に解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高等動物の記憶・学習などの神経活動は複雑な遺伝子発現制御を伴うと考えられ、これまでにncRNAもその一端を担うという証拠が報告されつつあるが、複雑さがゆえに高等動物では解析が難しい。本研究では、シンプルかつ解析が進んでいる神経系をもつ線虫*C. elegans*を用い、ヒトなどの高等動物にも進化的に保存されているドーパミン経路をモデルとし、ドーパミン経路の変異体で発現が変化するncRNAの候補を見つけた。本研究で得られた成果は、神経活動におけるncRNAの役割の解明だけでなく、さまざまな生理機能や神経疾患に関わるドーパミン経路の制御の解明にもつながることが期待でき、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：Noncoding RNAs (ncRNAs) are RNAs that do not code for proteins. Some reports are showing that ncRNAs are involved in diverse physiological functions and play a role in the regulation of neural activities such as memory and learning in higher animals. In this study, we analyzed ncRNAs and their regulatory factors involved in memory and learning using a mutant of the dopamine pathway in *C. elegans* as a model of simple neural functions, aiming to elucidate the complex regulatory mechanism of gene expression in higher neural functions. As a result, we obtained several candidate ncRNAs whose expression was altered in the dopamine pathway mutants compared to the wild type. In the future, we plan to analyze in detail how these candidate ncRNAs are involved in memory and learning.

研究分野：モデル生物を用いた分子遺伝学

キーワード：機能性RNA 線虫 ドーパミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノンコーディング RNA (ncRNA) は、タンパク質をコードしない RNA で、多様な生理機能に関与することがわかってきた。ncRNA は、近年の大規模なゲノム解析から膨大な数が発見され、長さや構造によって種類が分けられている。よく知られている RNA サイレンシングでは、主にウイルスなどの外因性の二本鎖 RNA (dsRNA) に由来する small interfering RNA (siRNA) や、ヘアピン型の前駆体としてゲノムにコードされている microRNA (miRNA) が、RNA 分解酵素 Dicer によって切断された後、Argonaute などのタンパク質と結合して RISC (RNA-induced silencing complex) という複合体を形成し、相補的な配列をもつメッセンジャー RNA (mRNA) の切断や翻訳の阻害などにより遺伝子発現の抑制に働くことが知られていた。研究開始当初、ncRNA は、組織特異的な発現パターンを有することや発生、疾患との関わりが明らかになりつつあり、記憶や学習など「変化」を伴う高次神経機能における役割も注目されてきていた。

神経細胞は、経験を通して刺激に対する応答性を一時的に変化させ、環境に適した応答ができるようになる（これを広義の「学習」と呼ぶ）。このような変化は、複雑な遺伝子発現制御を伴うと考えられ、上述の ncRNA もその一端を担っていると予想された。しかし、どの ncRNA がどのように記憶・学習や神経の可塑性に関与し、何のシグナルによって制御されているのかについては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、記憶や学習といった高次神経機能における遺伝子発現の制御メカニズムを解明するため、その制御メカニズムに関与する ncRNA の同定を行い、それらの機能や役割を見出すことを目的とした。哺乳動物などの高等動物では、膨大に存在する ncRNA と記憶・学習における複雑な脳・神経系の機能がゆえに、解析には困難が伴うと予想された。そこで、本研究では、ゲノムサイズが小さくシンプルな神経系をもつ線虫 *C. elegans* を主なモデルとした。*C. elegans* では、遺伝学的解析が容易であり、本研究では、主に遺伝子変異体を用いて記憶・学習に関与する ncRNA とその制御因子を探索し、個々の ncRNA の細胞レベルでの解析を通して、記憶・学習の過程で起こる複雑な遺伝子発現制御メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 既知の ncRNA 関連遺伝子変異体を用いた環境刺激応答の表現型解析

研究開始当初、線虫 *C. elegans* では、ncRNA の合成や輸送など機能発現に関連する遺伝子が複数同定されており、それらの遺伝子の変異体がストックセンターで入手できた。本研究では、まず ncRNA 経路と記憶・学習の関与を調べるため、既知の ncRNA 関連遺伝子の変異体を用いて環境刺激に対する応答性を調べるアッセイを行い、これらの変異体の変異遺伝子が環境刺激応答の記憶・学習へ関与するかを調べることにした。

線虫の環境刺激応答の行動アッセイでは、複数の誘引物質、忌避物質を用いて、記憶・学習の能力を評価し、野生型と比較して記憶・学習の能力が変化している変異体の探索を行った。

(2) ドーパミン経路の変異体を用いた small RNA 解析

線虫 *C. elegans* が示す匂い物質 2 - ノナノンに対する忌避行動では、事前に 2 - ノナノンに嗅いだ場合は匂いを記憶し「より遠くまで逃げる」こと、その機能にドーパミンシグナルが関与することが、木村幸太郎らにより報告されていた。そこで、木村幸太郎氏の協力を得て、この環境刺激応答に関与する ncRNA を探索するため、線虫のドーパミン経路に関わる遺伝子の変異体を用い、RNA シーケンシングを行った。

本研究では、ncRNA の中でも特に遺伝子発現や翻訳の制御に関わる ncRNA に注目したため、RNA サイレンシングに関与する siRNA や miRNA の発現を解析できる Small RNA シーケンシングを行った。

4. 研究成果

本研究では、まず(1)既知の ncRNA 関連遺伝子変異体を用いた環境刺激応答の表現型解析を行ったが、野生型と比較して記憶・学習の能力が顕著に変化している変異体が見つけれず、さらに同様の研究が別のグループにより行われ報告されたため、(2)ドーパミン経路の変異体を用いた small RNA 解析を中心に進めることとした。

(2)では、線虫で匂い学習に必要であることが知られているドーパミン経路の変異体から total RNA を抽出し、ncRNA の一部である Small RNA を分離して Small RNA シーケンシングを行い、野生型と比較した。その結果、野生型に比べて変異体で発現が上昇もしくは下降している ncRNA を複数確認できた。

また、これらの候補 ncRNA によって制御されるターゲット遺伝子もしくは同じ経路で機能する遺伝子の候補を探索するため、上述と同じ変異体を用いて total RNA シーケンシングによる遺伝子発現量解析を行った。その結果、野生型に比べて変異体で発現が上昇もしくは下降している遺伝子を複数確認できた。

今後は、これら候補となった ncRNA のうち、機能が種を超えて保存されていることが期待できる micro RNA に焦点を絞り、これらの候補 micro RNA がどのように記憶・学習に関与するか、発現部位の同定や変異体を用いた行動アッセイなどを用いて解析する予定である。

今回解析に用いたドーパミン経路は、ヒトにおいても、随意運動、情動、記憶・学習などの神経機能に重要な役割を担っており、パーキンソン病に伴う運動障害や統合失調症との関連が報告されている。本研究で得られた成果は、神経活動における ncRNA の役割の解明だけでなく、さまざまな生理機能や神経疾患に関わるドーパミン経路の制御の解明にもつながることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	木村 幸太郎 (KIMURA Kotaro) (20370116)	名古屋市立大学・大学院理学研究科・教授 (23903)	

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