

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06055

研究課題名(和文) 多様な生命活動を支える機能的RNA制御ネットワークの確立

研究課題名(英文) Toward the establishment of functional RNA regulatory networks that support diverse biological activities

研究代表者

富岡 征大 (Tomioka, Masahiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40466800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物はゲノム中の遺伝情報を多様化させるために、DNAでコードされた単一遺伝子から複数のメッセンジャーRNAを「選択的スプライシング」と呼ばれるプロセスにより作り、生体の構造や機能に必要な多様なタンパク質を作り出す。本研究は、この一連のプロセスが生物現象に果たす役割、機能について、線虫を用いて明らかにすることを目的とした。研究の結果、線虫の産卵のタイミングに関わる選択的スプライシング制御分子を同定し、また、線虫の学習行動に関わる選択的スプライシング制御分子及びそれが制御する分子の候補を明らかにした。さらに、選択的スプライシングにより産生された分子が学習行動において働く制御機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかにした、線虫の産卵のタイミングや学習行動を制御する分子群と同様の性質を持つ分子群(ホモログ)は哺乳類を含む異なる種にも存在する。従って、本研究を手掛かりに、線虫のみならず種間を通じて共通する分子機構の理解につながる可能性がある。本研究で注目した選択的スプライシングの破綻は様々な疾患と関連があることが分かっており、今後の研究の進展により疾患の原因の解明に貢献できる可能性がある。さらに、本研究で線虫が飢餓の危険を避け生存確率を上げるための仕組みの一端を明らかにしたことは、動物の行動を司るしくみを理解する上で学術的意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：To diversify the genetic information in their genomes, organisms generate multiple messenger RNAs from a single gene through a process called "alternative RNA splicing" to produce diverse proteins necessary for the structure and function of living organisms. The purpose of this study was to clarify the role and function of this series of processes in biological phenomena using *C. elegans*. As a result of our research, we identified a splicing regulator involved in determination of the timing of egg laying, as well as a splicing regulator involved in learning behavior and candidates of the target molecules in *C. elegans*. Furthermore, we clarified the regulatory function by a particular protein isoform produced by a splicing regulator in the learning behavior.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：選択的スプライシング インスリン 学習 化学走性 産卵 線虫

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、RNA の選択的スプライシング (Alternative Splicing を略し「AS」と以下では記す) を介した転写後調節は、遺伝子や細胞の機能の多様性を生み出すことで様々な生物機能に貢献している。疾患に関わる多くの変異が RNA スプライシングに関連したゲノム配列上に見つかっていることも、生物機能に RNA スプライシングが重要であることを裏付ける。一方で、タンパク質アイソフォームの多様性が実際にどのように、どこまで生物機能に貢献しているのか、個体レベルでのその役割は包括的な理解には至っていない。

我々は近年、線虫 *C. elegans* の多岐にわたる生物機能にインスリン受容体遺伝子「*daf-2*」における AS 制御が重要であることを明らかにした。*daf-2* 遺伝子から、カセットエクソン「exon 11.5」のスキップにより DAF-2a アイソフォームが包含により DAF-2c アイソフォームが産生される。興味深いことに、哺乳類のインスリン受容体遺伝子も同様の位置にカセットエクソンが存在し、*daf-2* と同様に 2 種のアイソフォームが産生される。DAF-2a アイソフォームは全身で産生されて、耐性幼虫形成や寿命の制御に重要な役割を持つ。一方、DAF-2c アイソフォームは、主に神経細胞の軸索に存在し、飢餓環境を避けるような学習行動を制御する。DAF-2a の機能は深い解析がなされていたのに対して、DAF-2c による学習行動の制御機構は殆ど不明であった。

daf-2 exon 11.5 の選択的スプライシングは、進化的に保存された複数の RBP により制御される。その中の Polypyrimidine tract-binding protein の線虫ホモログ PTB-1 は神経細胞の中でも限られた細胞種のみで発現し、他の RBP と協調的に働くことで、DAF-2c の産生を特定の神経細胞種に局限させている。PTB-1 は神経系以外にも、摂食器官や生殖器官などの中限られた細胞種に発現する。しかし、PTB-1 の摂食や生殖における役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノムサイズが小さく単純な構造をもつ *C. elegans* において働く選択的スプライシング (AS) 制御を調べることで、AS が生物機能に果たす役割を個体レベルで明らかにすることを目的とした。上記の背景に記述したように、生殖器官の中でも特定の細胞種のみで発現する PTB-1 の生殖機能に注目し、その役割を明らかにすることを目標として研究を開始した。次に、RNA 結合タンパク質である Muscleblind-like splicing regulator ホモログ MBL-1 の学習行動における役割に注目し、解析を進めた。また、これらと並行して、神経軸索に局在する DAF-2c の学習行動における詳しい機能の解析を行うことで、AS が生物機能に果たす役割の解析を行った。

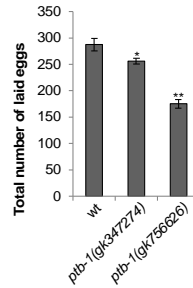
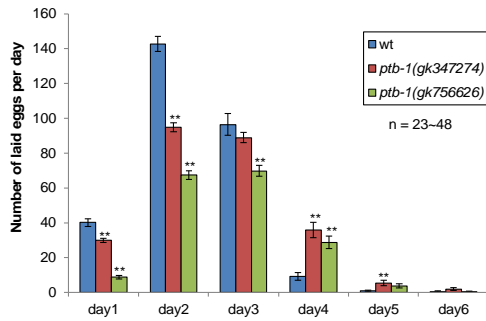
3. 研究の方法

本研究は、線虫 *C. elegans* を用いた、産卵や学習行動などの表現型解析、遺伝学的解析、分子生物学的解析、蛍光分子イメージングを主に用いた。注目する分子の欠失変異体を作成するために、CRISPR/Cas9 によるノックアウトを行った。MBL-1 や DAF-2c が制御する分子の機能細胞を明らかにするために、CRISPR/Cas9 による細胞特異的ノックダウン、cDNA を用いた細胞特異的レスキュー実験を行った。目的の遺伝子の細胞特異的発現の確認には、cDNA に SL2 を融合した蛍光タンパク質を用いた共焦点顕微鏡イメージングにより、発現細胞の同定を行った。

4. 研究成果

1) PTB-1 の産卵数及び産卵期間の制御に働く可能性

哺乳類では、Polypyrimidine tract-binding protein は 4 種類存在し、全身で発現する PTBP1 と神経系で主に発現する PTBP2 は脳の発生を制御する。トランスクリプトーム解析から、PTBP1 や PTBP2 が制御する RNA 群が同定されおり、幾つかの重要な制御機構が示されているが、その役割の全容は解明されていない。また、PTB の発現量の違いが脊椎動物種間の脳機能の違いを作り出すという興味深い可能性が示唆されおり、進化的側面からも PTB は重要な役割を持つと考えられる。線虫 PTB ホモログ PTB-1 は RNA 結合部位を 4 つもち (RNA-recognition motif1~4, RRM1~4)、これらは未成熟な mRNA の結合に重要であると予測される。変異体を用いた表現型解析の結果、RRM3 にナンセンス変異をもつ 2 種の *ptb-1* 変異体は産卵行動に異常を示した。すなわち、野生株と比べて産卵開始後 1~3 日の産卵数の減少、さらには 4~5 日目の産卵数の増加が観測され、総産卵数の有意な低下がみられた (図 1)。従って、PTB-1 は産卵に必要であることが示唆された。また、*ptb-1* 変異体は、野生型の産卵が殆ど終了する 4 日目も産卵を継続し、野生型では産卵を終了する 5 日目にも少ないながらも産卵がみられたことから、PTB-1 は産卵期間の短縮を促進する可能性が示唆された。



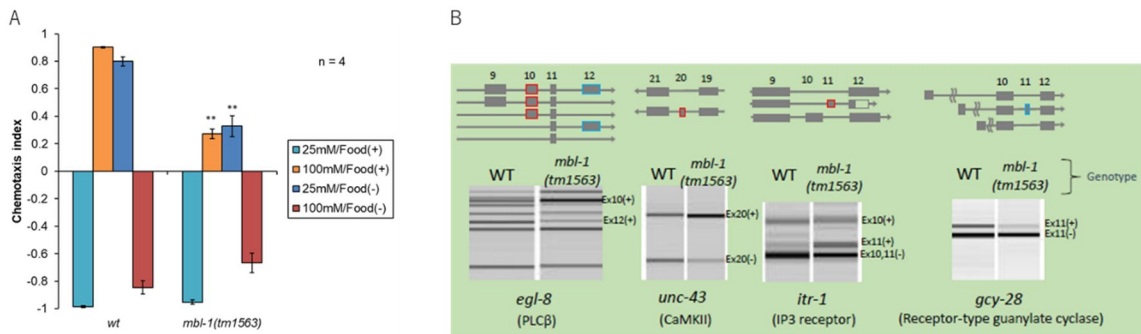
(図1) 野生株及び *ptb-1* 変異体の産卵数の観察 大腸菌株 OP50 を餌として与えて培養した線虫の産卵数を示した。

2) MBL-1 の塩走性学習における働き

RNA 結合タンパク質である MBNL の機能低下は筋強直性ジストロフィー (Myotonic dystrophy, DM)の原因の一つであり、DM 患者において筋機能異常が生じる原因の理解が進んでいる。一方、DM 患者の示す認知機能の異常が MBNL の異常に伴い引き起こされる機構の多くは分かっていない。線虫 MBNL ホモログ MBL-1 の変異体は、餌の有無と塩濃度との連合学習後の塩走性において高塩濃度への走性に強い異常を示した(図2A)。すなわち、野生型線虫は餌と共に低濃度(25mM)または高濃度(100mM)の食塩で条件付けを行うと、それぞれ、低塩濃度または高塩濃度に向かう。一方、飢餓環境で感じた食塩濃度からは忌避行動を示す。*mb1-1(tm1563)*欠失変異体は餌や飢餓で条件付けした後に高塩濃度に向かう走性に特に強い異常を示した(図2A)。

mb1-1 の機能細胞を決めるために、cDNA を用いた細胞特異的レスキュー実験を行った。*mb1-1* を神経系又は食塩を受容する ASER 味覚神経に発現させたところ、強制発現による走性異常の増強がみられたものの、走性異常の回復はいずれの場合も見られなかったため、機能細胞の同定には至らなかった。

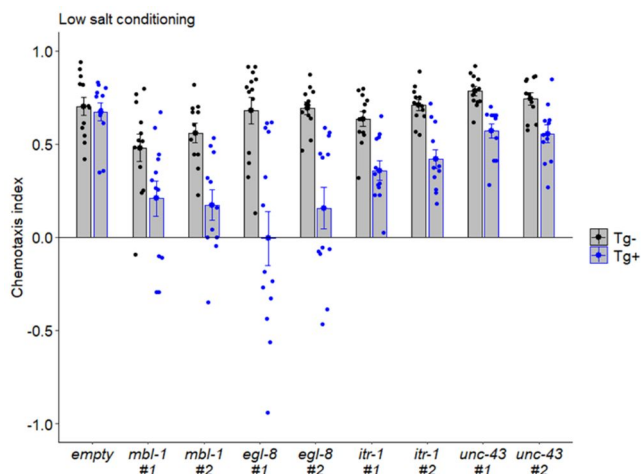
次に、*mb1-1* のターゲット候補を決めるため、*mb1-1* 変異体を用いたトランスクリプトーム解析の結果 (Norris ら、Elife 6:e28129(2017)における解析結果) を参考に塩走性の制御に関わることが知られるいくつかの遺伝子に注目し RT-PCR による解析を行ったところ、*mb1-1* に依存したスプライシングパターンの異常が検出された(図2B)。この中で、*gcy-28* の機能欠失変異体の塩走性を調べたところ、*mb1-1* 変異体と同様の高塩走性異常がみられた。他の遺伝子の機能喪失変異体はいずれも動きが異常であり、正しく塩走性行動を調べることが難しかったため、次段落示すように CRISPR/Cas9 法による神経特異的なノックダウンによりその表現型を調べた。



(図2) (A) *mb1-1(tm1563)*欠失変異体は高塩濃度への走性に異常を示す。Chemotaxis index は線虫の走性行動の程度を表し、正の値が高塩濃度への、負の値が低塩濃度への走性を表す。(B) 野生型と *mb1-1(tm1563)*変異体の total RNA を用いた RT-PCR アッセイの結果。

3) *egl-8*, *unc-43*, *itr-1* の神経特異的なノックダウンは *mb1-1* 変異体と同様の異常を示す細胞種特異的に遺伝子をノックダウンする方法として、2本鎖 RNA を細胞種特異的に発現させることによる細胞特異的 RNA 干渉法があるが、この方法では高濃度の DNA 断片を導入する必要があり、プロモーターの多量発現等による非特異的な効果が表れることがある。そこで、文献 (Shen ら、Developmental Cell 30, 625-636 (2014)) を参考に CRISPR/Cas9 法を用いた細胞種特異的なノックダウンを行った。Cas9 の発現量を検討したところ、発現による行動への非特異的な効果を与えない最適な濃度(用いるプロモーターにより異なるが、5ng/μl ~ 30ng/μl 程度)を見つけ、以下、図3に示すように *egl-8*, *unc-43*, *itr-1* の神経特異的なノックダウンによる高塩走性への影響を調べたところ、*mb1-1* のノックダウンと同様に塩走性に有意な異常がみられた。また、ASER 特異的なノックダウンによっても高塩走性に有意な異常、もしくは異常の傾向がみられた。前段落に記した *gcy-28* 変異体の行動アッセイの結果と合わせ、*egl-8*, *unc-43*, *itr-1*, *gcy-28* の機能低下もしくは欠損は *mb1-1* と同様の高塩走正常を示すといえる。*mb1-1* は選択的プライシング制御によりこれらの遺伝子の機能を調節することで、走性を制御している可能性が考えら

れる。



(図 3) CRISPR/Cas9 法による神経系特異的ノックダウン 各遺伝子に対するガイド RNA を全身に、神経系特異的に Cas9 を発現させることにより神経系特異的ノックダウンを行った。飢餓環境下で低塩濃度を経験させた後の塩走性行動を調べた。各遺伝子名の下番号は異なる 2 か所へのガイド RNA を表す。empty は陰性対照。

4) DAF-2c は 2 種の異なるホスホリパーゼ C を介して学習行動を制御する 複数の RBP による協調的な選択的スプライシングにより産生される DAF-2c が学習行動 (飢餓を経験した際の食塩濃度から忌避する学習) を制御する仕組みを、細胞種特異的 CRISPR/Cas9 法などの遺伝学的手法により解析した。その結果、DAF-2c は ASER 味覚神経において PLC-1 (ホスホリパーゼεホモログ) と EGL-8(ホスホリパーゼβホモログ) の 2 つのアイソザイムを介して学習行動を制御する制御機構が明らかになった。DAF-2c は PLC-1 を介して低塩濃度からの忌避行動を、EGL-8 を介して高塩濃度からの忌避行動を促進する。その結果、飢餓を経験した食塩濃度から広く分散するような学習行動を DAF-2c PLC によるシグナル伝達経路が制御することが明らかになった。この機構は、動物が飢餓環境を避け、餌を得る確率を上げるための生存戦略の一端であると考えられる。一連の結果は、学術論文 (Tomioaka ら、Commun Biol. 5(1):30 (2022)) に掲載されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Masahiro Tomioka, Moon Sun Jang, Yuichi Iino | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 DAF-2c signaling promotes taste avoidance after starvation in <i>Caenorhabditis elegans</i> by controlling distinct phospholipase C isozymes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 30 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02956-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yasuaki Ike, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino | 4. 巻 220 |
| 2. 論文標題 Involvement of HECT-type E3 ubiquitin ligase genes in salt chemotaxis learning in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Genetics | 6. 最初と最後の頁 iyac025 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/genetics/iyac025 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Takashi Nagashima, Yuichi Iino, Masahiro Tomioka | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 DAF-16/FOXO Promotes Taste Avoidance Learning Independently of Axonal Insulin-Like Signaling | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS Genet. | 6. 最初と最後の頁 e1008297 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008297 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masahiro Tomioka |
| 2. 発表標題 Functions of insulin-like peptide signaling in the <i>C. elegans</i> nervous system |
| 3. 学会等名 Kick-off Symposium of “International Research on Regulation of Insulin-Like Activities for Extension of Health Life Span” (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 富岡 征大 |
| 2. 発表標題 線虫の味覚における記憶学習を制御する分子機構 |
| 3. 学会等名 生理研研究会2021 「記憶・学習の多角的理解に向けたアプローチ」 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富岡 征大、Moonsun Jang、飯野 雄一 |
| 2. 発表標題 異なる細胞内部位で学習行動を制御するインスリン受容体アイソフォームの働き |
| 3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Tomioka and Yuichi Iino |
| 2. 発表標題 The function of axonal DAF-2c signaling in taste avoidance learning in <i>C. elegans</i> |
| 3. 学会等名 22st International <i>C. elegans</i> Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富岡 征大、ジャン ムンソン、飯野 雄一 |
| 2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の学習記憶に依存した行動切り替えを制御するインスリン経路の働き |
| 3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富岡 征大、永嶋 宇、ジャン ムンソン、飯野 雄一 |
| 2. 発表標題 線虫C. elegansの味覚忌避学習を制御するインスリン受容体アイソフォームの働き |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 昆野史弥、富岡征大、飯野雄一 |
| 2. 発表標題 線虫の学習行動から見たスプライシング制御因子の機能 |
| 3. 学会等名 線虫の未来を創る会/Future of the nematodes studies |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 昆野史弥、富岡征大、飯野雄一 |
| 2. 発表標題 線虫の学習行動から見たスプライシング制御因子の機能 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|-------|-----------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 昆野 史弥 (Konno Fumiya) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 飯野 雄一 (Iino Yuichi) (40192471) | 東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授 (12601) | |

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 |
|---------|---------|
| | |