

社会性を制御する長鎖 ncRNA の分子メカニズム

北海道大学大学院薬学院 RNA 生物学研究室

横井 佐織

[研究開始当初の背景]

受領者はメダカの社会性行動を研究しており、野生型メダカにおける社会性行動の頻度は相手との親密性に依存しないことを発見した。一方、受領者の作成したオキシトシン変異体メダカオスは初対面の個体に対し、求愛や攻撃行動をほとんど示さず、配偶者防衛行動（メスが他のオスと配偶行動を示さないよう、オスが妨害する行動。）も観察されなかった(Yokoi *et al.*, *PNAS*, 2020)。しかしながらこれら変異体は、親密な個体に対しては正常に求愛、攻撃行動を示し、配偶者防衛行動に至っては過剰防衛を示した。また、メスに関しては、野生型は親密なオスを配偶相手としてすぐに受け入れ、初対面のオスを拒絶する傾向にある。その一方で、変異体は初対面のオスに対してほとんど拒絶を示さなかった。従ってオキシトシン変異体メダカはオスもメスも、初対面の個体に対する社会性が低く、自閉症様の表現型を示すと考えられた。さらに、オキシトシン変異体と野生型の脳から RNA を抽出し、RNA-seq データから遺伝子発現プロファイルを比較したところ、発現量が異なった遺伝子の中には、ヒトにおいて自閉症リスクとの相関が報告されている複数の遺伝子が含まれていた。したがって、当該遺伝子の中には他にも自閉症関連遺伝子が含まれている可能性が高いと考えられた。

一方、自閉症患者の脳では正常者と比較して一部の lncRNA の発現量が異なる、との報告があり(Parikhshak *et al.*, *Nature*, 2016)、自閉症に関与する lncRNA の存在が示唆されている。しかしながらそれらの lncRNA が、自閉症にどのように関与するのかについては明らかになっていない。lncRNA 遺伝子はそのほとんどが機能未知であるが、その理由の一つとして lncRNA の中には転写の際のノイズである非機能性 lncRNA が含まれており、機能性の lncRNA 候補の選別が困難であったことがあげられる。受領者の所属する研究室では、機能性 lncRNA がタンパク質と強固に結合する傾向を利用し、当該 lncRNA を効率的に探索する手法 (UPA-seq 法) を開発することで、この問題をクリアするに至った。lncRNA の機能解析はほとんどが培養細胞レベルであり、個体レベルでの機能解析の重要性が認識されつつある。

[研究の目的]

前述した背景をうけ、本研究では、オキシトシン変異体の脳において高/低発現する機能性 lncRNA の機能解析を個体レベルで行い、メダカ自閉症様行動を制御する分子メカニズムを明らかにする。

[研究の方法]

1. Refseq のデータベース上で lncRNA と予測されている遺伝子をターゲットとして、RNAseq 解析の結果、オキシトシン変異体の脳において野生型と比較して発現変動している遺伝子を探索する。そして、同定した遺伝子のうち、UPA-seq 法により機能性 lncRNA であると予測される遺伝子を絞り込む。
2. 1. で同定した遺伝子のうち、発現量が多いものについて、*in situ* hybridization 法により脳内の発現パターンを可視化する。
3. 2. で脳内の発現パターンが確認されたり、脳に特異的に発現するなど行動制御に関与しそうな特徴的な発現パターンを示す遺伝子について、その変異体を作成し、自閉症様行動が確認されるかを検証する。
4. 3. で自閉症様行動が確認された遺伝子に関して具体的な機能予測を行う。

[研究成果]

1. オキシトシン変異体の脳において野生型と比較して発現変動している機能性 lncRNA 候補遺伝子の探索 Refseq のデータベースにおいて、lncRNA と予測されている遺伝子 3096 個のうち、オキシトシン変異体脳で発現変動している遺伝子 (FDR<0.05, basemean/length>0.03) は 29 個であった。また、その中で UPA-seq 法により機能性 lncRNA であると予測された遺伝子は 14 個あり、そのうち 10 個がオキシトシン変異によって発現量が低下した遺伝子、4 個が上昇した遺伝子であった。

2. 候補遺伝子の脳内発現パターンの可視化

オキシトシン変異によって発現量が上昇/低下した機能性 lncRNA 候補遺伝子のうち、最も発現量が多かった遺伝子 X と Y についてプローブを設計し、*in situ* hybridization 法により脳内の発現パターンを可視化した。オキシトシン変異によって発現量が上昇した遺伝子 X (図 1) については、哺乳類扁桃体に相当する Dm 領域と哺乳類視索前野に相当する POA 領域にシグナルが検出された。これらの領域はどちらも哺乳類において社会性行動を制御するとの報告がある (Raam *et al.*, 2021) とともに、メダカにおいてオキシトシン受容体が発現する領域 (Yokoi *et al.*, PNAS 2020) であった (図 2A-C)。また、蛍光 *in situ* hybridization 法により遺伝子 X の細胞内局在を可視化したところ、核内でのみシグナルが検出され (図 2D)、遺伝子 X はデータベースの予測通り、ncRNA であると考えられた。

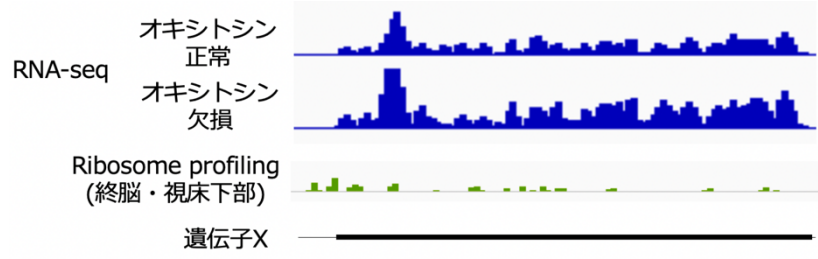


図1 オキシトシン欠損により発現上昇する遺伝子X。Ribosome profilingの結果からも、翻訳されないと予測される。

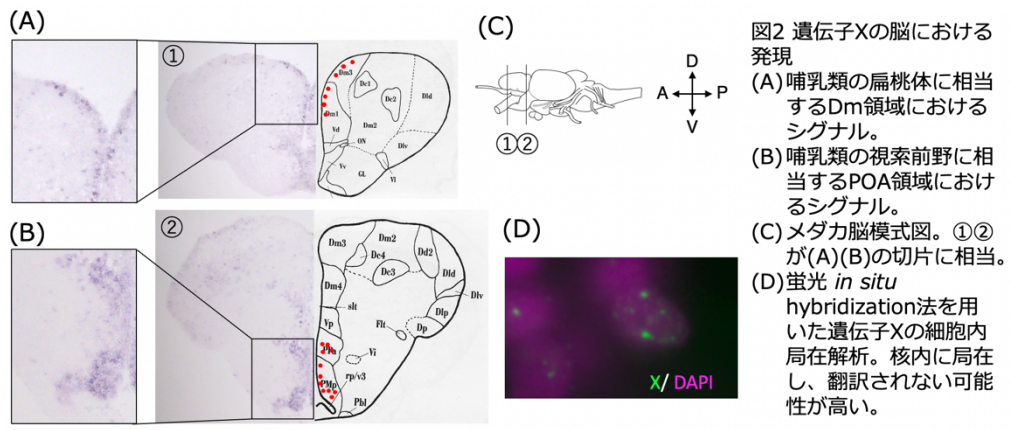


図2 遺伝子Xの脳における発現
(A)哺乳類の扁桃体に相当するDm領域におけるシグナル。
(B)哺乳類の視索前野に相当するPOA領域におけるシグナル。
(C)メダカ脳模式図。①②が(A)(B)の切片に相当。
(D)蛍光 *in situ* hybridization法を用いた遺伝子Xの細胞内局在解析。核内に局在し、翻訳されない可能性が高い。

一方、オキシトシン変異によって発現量が低下した遺伝子 Y については、Ribosome profiling の結果、lncRNA 予測されている遺伝子ながら、ショートペプチドをコードしている可能性が高いと考えられた (図 3)。そもそもデータベース上の lncRNA 予測は、100 アミノ酸残基以下の小さな ORF に対して翻訳が行われていないだろうとの仮定のもとに行われており、近年、こうした小さな ORF から実際にショートペプチドが翻訳され、生体内で機能を果たすことが報告され始めている (Matsumoto *et al.*, 2018)。したがって、遺伝子 Y もそうしたショートペプチドの一つであると考えられた。RNAseq 解析データの再解析の結果、遺伝子 Y は神経系特異的に発現する遺伝子であることが判明した。また、*in situ* hybridization 法により脳内の発現パターンを可視化したところ、ミエリン構成タンパク質である mbpa の *in situ* hybridization 法による脳内発現パターンと酷似していた (図 4)。

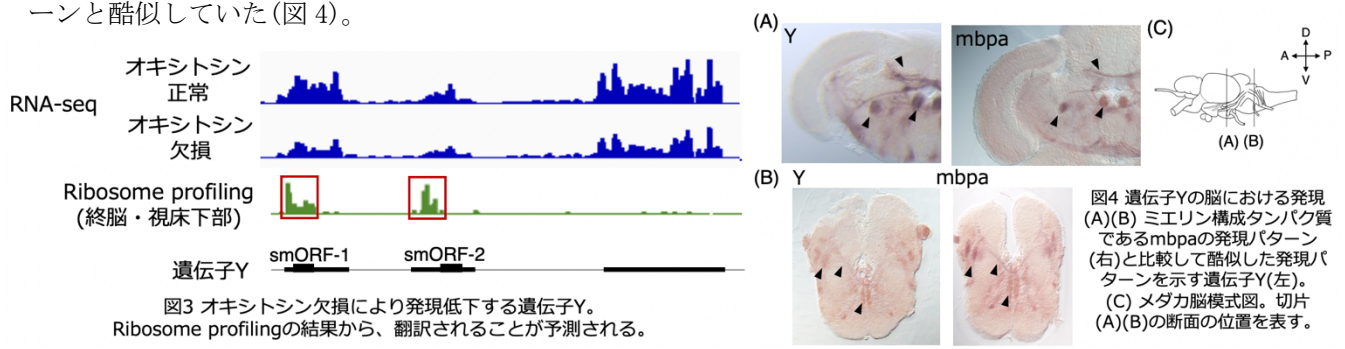


図3 オキシトシン欠損により発現低下する遺伝子Y。Ribosome profilingの結果から、翻訳されることが予測される。

図4 遺伝子Yの脳における発現
(A)(B) ミエリン構成タンパク質であるmbpaの発現パターン(右)と比較して酷似した発現パターンを示す遺伝子Y(左)。
(C)メダカ脳模式図。切片(A)(B)の断面の位置を表す。

3. 遺伝子変異体の作製と表現型解析

オキシトシン欠損により発現量が上昇した遺伝子 X に関し、その全長が欠失するように sgRNA を設計し、CRISPR/Cas9 法を用いて変異体を作出することに成功した。オキシトシン欠損により発現量が上昇する、ということは、オキシトシン欠損をバックボーンとした際に、遺伝子 X を欠失させることで、オキシトシン欠損個体の行動異常が検出されなくなることが期待された。したがって、オキシトシン変異体と遺伝子 X の二重欠損個体の作出をかけあわせにより試みた。しかしながら、二重欠損個体は存在は確認されたものの、数が少なく生存率も低い傾向にあった。成魚が確認されるということは胚性致死ではないことを意味すると考えられるため、今後ストレスの少ない飼育環境で交配を行うなどして二重欠損個体の確立を達成したい。

一方、オキシトシン欠損により発現量が低下した遺伝子 Y に関して変異体を作成し、行動実験を行ったところ、オキシトシン欠損オスと同様の表現型を示した。具体的には、親密度の高い、見知ったメスに対する求愛回数と、親密度の低い、初対面のメスに対する求愛回数を比較した。野生型のオスは親密度によらず同程度の求愛回数を示すのに対し、オキシトシン欠損オスと遺伝子 Y 欠損オスの初対面のメスに対する求愛回数は、見知ったメスに対する求愛回数よりも有意に少なく、自閉症様の行動を示した(図 5)。

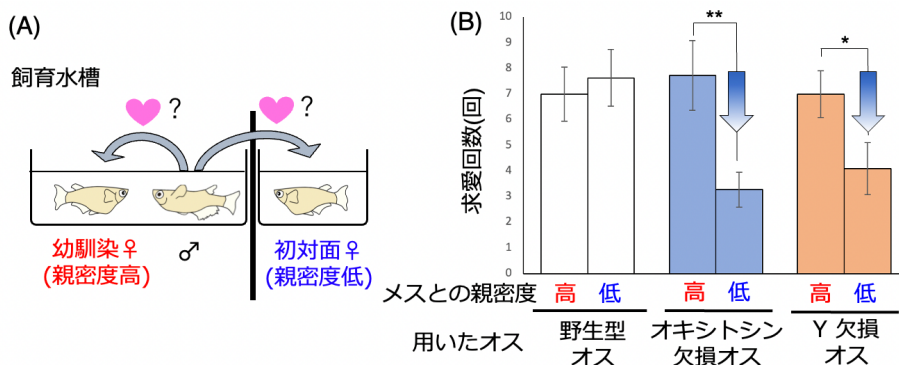


図5 Y欠損オスにおける自閉症様行動
(A)実験概要。親密度の高いメスと低いメスに対する求愛回数を測定した。
(B)結果。Y欠損オスは親密度の低いメスに対する社会性が低い傾向にあった。

4. 着目遺伝子の詳細な機能解析
遺伝子 Y が自閉症様行動に関与することが明らかになったため、その作用機序を調べるために、FLAG KI メダカの作出を試みた。これにより、遺伝子 Y が実際に翻訳されているのかを明らかにし、翻訳されている場合はタンパク質レベルでの発現解析や、タンパク質 Y と相互作用するタンパク質の解析が可能となる。Ribosome profilingの結果と、ORF 予測の結果をもとに、CRISPR/Cas9 法を用いて遺伝子 Y の ORF 直下に FLAG 配列を KI した個体に対し、抗 FLAG 抗体を用いた抗体染色を行ったところ、ミエリンと思われる組織の染色が確認された(図 6)。したがって、やはり遺伝子 Y は翻訳されており、ミエリンタンパク質である可能性が考えられたため、Y 変異体においてミエリン異常が検出されるかを検証することにした。図 4 でも用いた mbpa の *in situ* hybridization 法により Y 変異体におけるミエリンを染色したが、野生型と比較して顕著な異常は検出されなかった。そこで、電子顕微鏡による詳細なミエリン観察をおこなったところ、ミエリンの一部のゆるみが確認された。したがって、ミエリンのゆるみによる神経伝達異常が行動異常につながった可能性が考えられた。

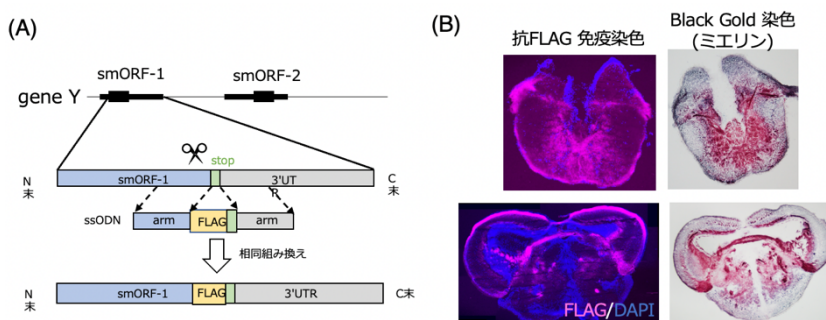


図6 FLAG KIメダカの作製
(A)KI作製概要。ssODNとCRISPR/Cas9システムを用いてORF直下にFLAGを導入した。
(B)FLAG KI個体の染色(左)パターンがミエリンのパターン(右)と酷似している。

[まとめと今後の展望]

本研究では、オキシトシン変異体メダカを用いた RNAseq と UPaseq とを組み合わせ、自閉症様行動を制御する機能性 lncRNA 候補を 14 個同定するにいたった。そのなかでも発現量が多かった遺伝子 X はオキシトシン欠損により発現量が上昇し、核内に局在することから翻訳はされていないと考えられた。また、オキシトシン受容体の発現領域に発現することから、オキシトシンとの関係性が深いことが予測されるとともに、社会性行動を制御する領域に発現することから、社会性行動との関係性も深いことが予測された。一方、オキシトシン欠損により発現量が低下した遺伝子 Y は、Ribosome profiling の結果から、実際にはショートペプチドをコードする遺伝子であると予想され、ORF 直下への FLAG KI によりこの予測が正しいことが判明した。また、遺伝子 Y の欠損オスは、オキシトシン欠損オスと同様に初対面のメスに対する求愛頻度が低く、自閉症様行動を示した。Y はミエリンに発現するタンパク質であり、Y 変異体におけるミエリン異常を検証した所、軽微ではあるがミエリンのゆるみが観察された。オキシトシンはマイクログリアの活性制御を介してミエリン形成に影響を与えることが報告されており (Mairesse *et al.*, 2018)、これもタンパク質 Y を介した影響があるのかもしれない。Y 変異体メダカにおいてオキシトシンの発現量が少ないことも、これらの相互作用を暗示している。一方、これまでミエリンと自閉症との関係性についてはこれまでほとんど報告がないことから、本研究を進めていくことで、自閉症の分子メカニズムを新たな視点から明らかにできる可能性がある。現在 FLAG KI 個体の脳から抽出したタンパク質を用いて抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、Y タンパク質と相互作用するタンパク質の質量分析をおこなっている。これにより、Y タンパク質の細胞内挙動を詳細に明らかにし、行動異常の原因究明につなげたい。本研究が将来的に、脊椎動物間で保存された自閉症様行動のメカニズム解明、ひいてはその治療法の発見につながることを期待している。