

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07247

研究課題名(和文) Elavl2による脳内翻訳制御機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of Elavl2 dependent translational mechanism in brain

研究代表者

矢野 真人 (Yano, Masato)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：20445414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経特異的に発現する翻訳制御因子として知られるRNA結合蛋白質Elavlファミリーのうち、特徴的な発現パターンを有するElavl2に着目し、Elavl2依存的な翻訳制御プログラムの解明を目指した解析を行った。包括的Elavl2-RNA相互作用マップ解析(HITS-CLIP法)、in vivoリボソームプロファイリング解析と通常のRNAシーケンス解析を同時に行い、生体内翻訳制御解析システムを構築した。さらにその結果、Elavl2標的遺伝子群として、神経細胞、シナプス機能に関わる遺伝子群の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生きたマウス脳組織中の細胞内におけるメッセンジャーRNAから機能性蛋白質の生合成過程をスナップショットすることで、生体内制御解析システムを構築するものである。特にアジア人における統合失調症トップ候補因子としても知られる神経特異的RNA結合蛋白質Elavl2を対象とした本研究による分子基盤の包括的理解は、翻訳制御の破綻によって引き起こされる精神、神経疾患の原因、メカニズム、治療戦略への基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on neuron specific RNA-binding protein, Elavl2 which display a unique expression pattern among Elavl family proteins to reveal Elavl2-dependent translational regulatory program in living brain. We established an in vivo analysis strategy for translational mechanism by using comprehensive Elavl2-RNA interaction map analysis (HITS-CLIP method), in vivo ribosome profiling analysis and regular mRNA sequence analysis. In this study, we succeeded in identifying genes involved in neuronal cell and synaptic function as Elavl2 target genes in the developing brain.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：RNA結合蛋白質 HITS-CLIP 翻訳制御 リボソームプロファイル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞における蛋白質合成は、様々な精神・神経疾患と関わりが強く注目を集めている。この神経系における翻訳制御は、神経細胞特異的な RNA 結合性翻訳因子によって適切に制御されていると考えられる。例えば、脆弱性 X 症候群の原因遺伝子である FMRP は、神経細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質であり、FMRP の発現異常による翻訳制御の破綻によりシナプス関連蛋白質群の過剰産生が疾患の原因と考えられている。その一方で、生理学的条件下の個体レベルでの翻訳制御解析は、他の転写制御、RNA プロセッシングなどの RNA 階層における遺伝子発現解析と比べ、脳内で正確に捉える事は技術的に困難であった。

本研究課題で着目する Elavl2 遺伝子は、近年の GWAS 解析により Elavl2 遺伝子イントロン1領域の SNP がアジア人における統合失調症トップ候補因子として報告されている(Plos One 2011)。また、Elavl2 遺伝子は、神経細胞特異的 RNA 結合蛋白質をコードする遺伝子で、Elavl ファミリー(HuB,C,D とも呼ばれる)の一員であり、特に翻訳制御に関わる分子ファミリーとして知られている(Mol Cell 2009)。また、Elavl2 は成体脳の海馬領域で他の nElavl ファミリーと比べ非常に限局した抑制性神経細胞への発現を示す事、また神経活動依存的な発現制御を受けていることを明らかにしている (Ohtsuka and Yano* et al. BBRC 2015)。

2. 研究の目的

本研究では Elavl2 がどのような mRNA 群を標的とし、どのような翻訳制御メカニズムによって行われているかを明らかにすることを目的とした。これまで同じファミリーメンバーである nElavl の *in vitro* 翻訳制御解析によって詳細な翻訳制御メカニズムが明らかになりつつある。*In vitro* モデルにおいて、Elavl4 は基本的翻訳因子 eIF4A との直接相互作用を介し、polyA 鎖依存的に翻訳効率を上昇させるモデルが確立されている(Fukao et al 2009,2014)。今回、我々は、Elavl2 欠損マウスを用いて、より生理学的条件に近いマウス脳を用いた分子生物学的解析技術により、Elavl2 による翻訳制御のメカニズムを包括的に解明とその生理学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) HITS-CLIP 解析によるトランスクリプトームワイド Elavl2 蛋白質-RNA 相互作用マッピング。

具体的には、マウス胎生期の脳を試料とし、Elavl2 抗体の特異性を Elavl2 の欠損マウス脳を用いて検証精査した。特異性を確認後、Elavl2 欠損マウス脳をネガティブコントロールとした、Elavl2-HITS-CLIP 解析を実施した。次に、より詳細な RNA 結合部位の同定技術として CIMS (cross-linked induced mutation site) 法あるいは CITS(cross-linked induced termination 解析を実施し、1塩基解像度での RNA マッピングを行った。

(2) *In vivo* リボソームプロファイルによる Elavl2 による翻訳制御遺伝子の同定。

Ingolia らによって開発されたリボソームプロファイル解析 (Cell 2011) を、細胞系ではなく、生きたマウス脳組織そのものを用いた対象として実施する。対照実験として、Elavl2 欠損マウス脳、野生型脳を用いて比較解析する。通常の mRNA シークエンス解析も同時に実施した。

(3) マルチオミクス解析による生体内翻訳制御解析システムを確立、Elavl2 の翻訳制御メカニズムおよび ELavl2 の生理機能の解明。

Elavl2 の標的遺伝子群に対する翻訳効率の変動を正規化し、Cumulative frequency 解析により明らかにした。また、標的遺伝子群の Go 解析を実施し、Elavl2 の標的遺伝子群の生理機能の予測を行った。

4. 研究成果

本研究課題において、以下に示す新たな知見が得られている。

(1) 生体内 HITS-CLIP 解析では、RNA 結合蛋白質の RNA 結合部位について、CIMS、CITS 解析いずれとも実施した。目的の蛋白質が結合する部位の同定について、両者とも良好な結果が得られ、論文報告した (Hayakwa-Yano et al Genes Dev 2017, Yano et al in submission 2019)。Elavl2 はこれまでの既報通りに、U-rich 配列に結合していることが見出されている。その際、U-rich 配列を内包する二次塩基としてこれまでプリン塩基 (A or G) が優位とされていたがピリミジン塩基である C も同様に標的部位に存在していることが分かった。今回、Elavl2 の HITS-CLIP 解析を実施し、1000 種類以上の特異的標的遺伝子の同定に成功した。

(2) 野生型および Elavl2 欠損マウス脳を用い、生きたマウス脳内における翻訳中の mRNA プロファイリングを、包括的定量的解析技術(in vivo リボソームプロファイリング法)と通常の RNA シークエンス解析を同時に行い、ゲノムマッピングを行った。リボソームによりプロテクトされた cDNA ライブラリーのサイズは予想通り、26 塩基程度に濃縮され、遺伝子のコーディング領域のみに収束する正確な包括的マッピング像を得ることに成功した。

(3) (1)(2)の統合解析により、全遺伝子に対して、Elavl2 標的遺伝子群との翻訳効率を比較検証した結果、Elavl2 欠損マウスにおける標的遺伝子群の翻訳効率が減少していることが明らかとなった。つまり、Elavl2 はその標的遺伝子群に対し、翻訳を正に制御していると考えられる。以上の結果は、本マルチオミクス技術を組み合わせた統合的解析により、脳組織そのものを扱った生体内翻訳制御解析システムの構築を行うことができたと言える。

また興味深いことに、Elavl2 標的遺伝子群は、他の脳内における RNA 結合蛋白質に比し、神経細胞機能、シナプス機能に関わる遺伝子群が優位にエンリッチされる遺伝子群が標的となっていることが GO 解析により分かった。これら遺伝子の発現破綻は、Elavl2 の欠損、あるいはノックダウン実験では、sholl 解析により有意な神経突起の形態、分岐点の数の減少に関わっていることが示唆されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Hayakawa-Yano Y and *Yano M: An RNA Switch of a Large Exon of Ninein Is Regulated by the Neural Stem Cell Specific-RNA Binding Protein, Qki5. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 26;20(5). pii: E1010 (*Corresponding Authors & Last author)
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.3390/ijms20051010
2. Ogawa, Y, Yamaguchi, J, Yano, M, Uchiyama, Y and Okano, HJ: Elavl3 regulates neuronal polarity through the alternative splicing of an embryo-specific exon in AnkyrinG. *Neurosci Res* 2018 Mar 31 pii: S0168-0102(18)30038-5
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1016/j.neures.2018.03.008
3. Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Yugami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, *Okano H, and *Yano M: An RNA-binding protein Qki5 regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. *Genes Dev.* 2017 31:1910-1925 (*Corresponding Authors & Last author)
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1101/gad.300822.117
4. Yano M*, Hayakawa-Yano Y and Okano H*: RNA Regulation went wrong in neurodevelopmental disorders: the example of Msi/Elav RNA binding proteins: *Int J Dev Neurosci.* 2016 Dec;55:124-130.(*Corresponding authors)
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016. 01.002
5. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka T, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H and Yoshikawa T: Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion: *Translational Psychiatry* 2016 Nov 1;6(11):e934.
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1038/tp.2016.206.
6. Fox RG, Lytle NK, Jaquish DV, Park FD, Ito T, Bajaj J, Koechlein CS, Yano M, Kopp J, Kritzik M, Sicklick J, Sander M, Shibata S, Valasek M, Sasik R, Scadeng M, Okano H, Kim Y, MacLeod AR, Lowy AM and Reya T: Image based identification and targeting of cancer stem cells in pancreatic adenocarcinoma: *Nature.* 2016 Jun 6;534(7607):407-11
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1038/nature17988

7. Bertolin AP, Katz MJ, Yano M, Pozzi B, Acevedo JM, Blanco-Obregón D, Gándara L, Soriano E, Kanda H, Okano H, Srebrow A, Wappner P.: Musashi mediates translational repression of the Drosophila hypoxia inducible factor: *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 19;44(16):7555-67.
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1093/nar/gkw372.
8. Ichiiyanagi N[#], Fujimori K[#], Yano M^{*}, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H^{*}: Establishment of in vitro FUS-associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells: *Stem Cell Reports.* 2016 Apr 12;6(4):496-510 (* Corresponding authors, [#]equally contributed first authors)
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.1016/j.stemcr.2016.02.011.
9. 矢野真人, 岡野栄之: 幹細胞、癌における細胞運命決定因子 Musashi の役割: 日本臨床 (2016年 12月)
10. 矢野真人: RNA 結合蛋白質の機能解析最前線 新潟医学誌 2016年 第130巻 第2号 p79-84
11. 矢野真人 : 「非コード RNA」「脳科学辞典」(web 辞書) 2016年 5月 25日
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.14931/bsd.6736
12. 矢野真人 : 「RNA 結合蛋白質」「脳科学辞典」(web 辞書) 2016年
 - ・ 査読あり
 - ・ doi: 10.14931/bsd.6734

[学会発表] (計 10 件)

1. 矢野真人; “蛋白質-RNA 相互作用マッピングは、新しい RNA 制御モデルと RNA 制御オリゴの同定を可能にする” 第 18 回日本再生医療学会シンポジウム「RNA 技術と幹細胞研究の最前線」 2019年 3月 (招待講演)
2. Hayakawa-Yano Y and Yano M: Qki5 HITS-CLIP provides new mechanisms of RNA regulatory loop: The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience "RNA Neobiology" 2019年 2月 ポスター発表
3. 矢野真人: バイオジェン 40 周年記念レセプション:ニューロサイエンス過去現在未来パネルディスカッション with フィリップ・シャープ博士 (ノーベル賞受賞者 2018年 11月) (招待講演)
4. 矢野真人; “中枢神経系の細胞アイデンティティを創出する RNA 結合蛋白質の解析” 武田薬品工業 SIL エキスパートシンポジウム”RNA-Binding Proteins in Neuroscience” 2018年 7月 (シンポジウムの主催、招待講演)
5. Yano M, Okano H, Sakimura K, Takebayashi H, Suyama S and Hayakawa-Yano Y: “Cell-type specific RNA-binding proteins in the developing central nervous system”RNA 制御から理解する神経発生と疾患 第 41 回日本神経科学大会シンポジウム 2018年 7月(シンポジウムの招待講演)
6. Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Yugami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, ^{*}Okano H, and Yano M: An RNA-binding protein Qki5 regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. 第 41 回日本神経科学大会 2018年 7月 ポスター発表
7. Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Yugami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, ^{*}Okano H, and Yano M: An RNA-binding protein Qki5 regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. 第 8 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム 2018年 2月 ポスター発表
8. Hayakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Yugami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, ^{*}Okano H, and Yano M: An RNA-binding protein Qki5

regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling.
CSHL meeting "40Years of mRNA splicing from discovery to therapeutics (国際学会) 2017年
10月 ポスター発表

9. 矢野真人, 矢野佳芳, 岡野栄之; Alternative splicing in neural stem cells: 第39回日本分子生物学会(シンポジウム:オーガナイザーおよび講演: RNA 結合蛋白質による細胞運命制御) 2016年11月
10. 矢野真人:神経発生・疾患と RNA 結合蛋白質 第46回新潟神経学夏期セミナー (セッション監修: RNA と神経疾患) 2016年7月(シンポジウムの招待講演)

[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

- ・ <https://researchmap.jp/taroshiro/>
- ・ 新規の神経幹細胞制御因子として Quaking5 の機能を解明しました
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2017/36258/>
- ・ 新規の神経幹細胞制御因子として Quaking5 の機能を解明
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/10/13/28-24759/>
- ・ unbiased なストラテジー <https://ncrna.jp/blog/item/346-unbiased>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：矢野 佳芳（早川佳芳）

ローマ字氏名：Yoshika Hayakawa-Yano

所属研究機関名：新潟大学大学院

部局名：医歯学総合研究科

職名：産学官連携研究員

研究者番号（8桁）：60397320

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。