

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02580

研究課題名(和文) 神経回路の活動依存的発達におけるmRNA化学修飾の役割

研究課題名(英文) mRNA chemical modification in activity-dependent establishment of neural circuits

研究代表者

王丹(Wang, Dan Ohtan)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50615482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは周りの環境や環境変化を正しく認知し、蓄積した記憶情報に基づいて、適切な行動を出力することができる。我々は脳の環境依存的な機能獲得に、RNAのm6A修飾が神経微小管末端における局所翻訳を通して、細胞骨格の構造と機能を活動依存的に制御し、活動依存的な神経発達に役割を果たすのではないかと考えた。遺伝子改変動物および培養細胞を用いたイメージング解析を行った結果、軸索にmRNAの輸送に必須であるRNA結合蛋白APCの発現にRNAのm6A修飾が必須であり、その欠損は微小管の動的制御および軸索の成長に役に立つことを見出した。さらに自閉症に関連する遺伝子変異がこの経路に影響を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の発達には環境との相互作用が必須であるが、基本的なメカニズムが明らかになっていない。神経細胞における局所翻訳がシナプスの機能に大きな役割を果たしているため、環境依存的回路形成に深く関わると推測できるが、詳細な制御機構が明らかではない。一方、“Epitranscriptome”はRNA化学修飾の全貌を表す「オーム」として2017年に確立され、個体発生、癌、肥満、神経科学など多くの生命分野に寄与してきた。脳の病気と特に関連すると考えられているが、その作動メカニズムに不明点が多い。本研究はその関連性について検証した結果、RNA修飾によるタンパク質の発現制御が軸索の成長に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A human can accurately recognize his/her surrounding environment and environmental changes. This capability is gained through accumulated experience and memory, producing appropriate actions to the ever-changing environment. We hypothesized that RNA m6A modification plays a role in activity-dependent neural development by controlling the structure and function of the cytoskeleton in an activity-dependent manner. We further reasoned that such a function can be mediated by local translation at the neuronal microtubule ends during neurodevelopment. Using imaging analysis in genetically modified animals and cultured cells, we found that RNA m6A modification is essential for the expression of the RNA-binding protein APC, which is necessary for the transport of mRNA in axons, and its deficiency affects the dynamic control of microtubules and axon growth. Furthermore, we discovered that gene mutations associated with autism affect this pathway.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 RNA化学修飾 シナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは周りの環境や環境変化を正しく認知し、蓄積した記憶情報に基づいて、適切な行動を出力することができる。脳が外部環境の経験とともに成長し、機能を獲得していく過程において、ゲノム情報はどのように役立つか？これまで、「ゲノム」と「環境」の相互作用の場として、エピジェネティクス研究が主に行われ、多分野に大きなインパクトを与えた。しかし、神経回路内に情報を貯蔵し、出力を制御する分子基盤としては、エピジェネティクス機構は転写を制御するが故に、時空間分解能が低い。さらに、既存モデルでは説明できない事象が近年次々と報告され、新規メカニズムの存在が示唆されはじめている。我々はシナプスに局在する多くの精神疾患関連遺伝子の mRNA が m6A メチル化される現象を発見した (Nat Neurosci, 2018)。シナプス付近で m6A を読み取るタンパク質 YTHDF1 あるいは YTHDF3 を神経細胞でノックダウンすると、シナプスの形態および伝達機能に異常が起きる (Nat Neurosci, 2018)。さらに YTHDF1 欠損マウスにおいては海馬依存的な空間記憶障害が起きる (Nature, 2018)。これらの結果から、RNA 化学修飾は遺伝情報コードを拡張し、外部入力に柔軟に対応して脳内活動依存的な遺伝子発現を制御する機能が期待されるが、未だ仮説段階であり、詳細な解析が求められている。興味深いことに、YTHDF1 欠損で発現が低下した APC (adenomatous polyposis coli) は、微小管の動的末端に局在する巨大な mRNA タンパク複合体のハブタンパク質であり、細胞骨格の制御および神経発達を制御するタンパク質として知られている (Nature, 2008; Cell, 2014)。APC 欠損マウスでは社交性の低下や行動の単調化など自閉症の症状に類似した社会行動パターンが報告されている (Mol Psychiatry, 2014)

2. 研究の目的

これまでの研究結果に基づいて、我々は脳の環境依存的な機能獲得に、RNA の m6A 修飾が神経微小管末端における局所翻訳を通して、細胞骨格の構造と機能を活動依存的に制御し、活動依存的な神経発達に役割を果たすのではないかと考えた。予備実験において、APC 複合体に m6A -mRNA がエンリッチしていることや、YTHDF1 が存在することがわかった。本研究では、大脳皮質と海馬の興奮性神経細胞において m6A シグナルが正常に読み取れない YTHDF1 cKO モデルマウスを用いて、RNA メチル化の脳精神機能における役割を明らかにする。既存のエピジェネティクスとの違いを明らかにするために、「局所」、「活動依存的神経発達」、「脳機能」の 3 つのキーワードについて検証し、「遺伝子」と「環境」を繋ぐ「分子～細胞～組織～個体」における多層における表現型を解析する。

3. 研究の方法

主に 3 つの実験系で実験を行った。

(1) 初代神経培養細胞に shRNA を導入して、m6A シグナル経路を司るタンパク質をノックダウンすることによって loss-of-function の実験を行い、微小管の組成 (Tubb subunits, MAPs, etc)、構造 (電子顕微鏡観察)、動態 (EB3 トラッキング、GFP タイムラプスイメージング) および輸送機能の変化を検証した。さらに、神経発達による軸索、樹状突起、およびスパインの形態変化を定量的に評価した。

(2) YTHDF1 欠損下神経細胞における APC 複合体など含む網羅的にタンパク質の発現変化を測り、YTHDF1 欠損下で成長円錐とスパインの応答性と構造可塑性について検証し、動的微小管末端の機能に依存するアクチンネットワークの発現と機能を探索した。

(3) 行動テストバッテリーを用いて、YTHDF1 (-/-, CamK2a) マウスの感覚、運動、注意、活動性、情動特性、社会性、記憶の 7 つの領域にわたる機能を測定した。

(4) 人との保存性について検証するために、網羅的に m6A 修飾されている RNA の発現変化を探索するためのアルゴリズムを開発し、

4. 研究成果

具体的には、神経の繋ぎがもっとも活発に形成される生後 3 週間における海馬での m6A 発現変化をゲノムワイドで網羅的に調べシナプス形成の盛んな時期にともなって RNA 修飾が増加するエヴィデンスを見出した。さらに、tRNA における修飾や進化的角度から pseudogene における RNA 修飾について加速することを見出し、ヒトの脳機能における発達と進化との関連性が示唆された。さらに死後脳を用いた RNA の定量的に評価し、うつ病を患っている女性と男性患者から m6A の関わり方が異なることを見だし、精神疾患と RNA 修飾の関係性は性別に依存することを

明らかにした。マウスやヒトにおける RNA 修飾による脳機能特に環境依存的な変化について、研究成果を上げ下記の論文にまとめ発表した。

*筆頭著者

Joshi K* and **Wang DO*** epidecodeR: a functional exploration tool for epigenetic and epitranscriptomic regulation. *Briefings in Bioinformatics*, 25 (2), 2024

Joshi K, **Wang DO***, Gururajan A*. The m6A-methylome in major depression: a bioinformatic analysis of publicly available datasets. *Psychiatry Research Communications* 2(4), 2022

Li W, Cheng T, Jiang T, Zhou M, Gong B, Zhao G, Li J, Tan R, Yang X, Joshi K, Peng Y, Cheng M, Li T*, **Wang DO***, Zheng J*. Hepatic RNA adduction derived from metabolic activation of retrorsine in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*. Sep 365(25), 110047, 2022

Uchiyama J, Roy R, **Wang DO**, Morikawa K, Kawahara Y, Iwasaki M, Yoshino C, Mishima Y, Ishihama Y*, Imami K*. pSNAP: proteome-wide analysis of elongating nascent polypeptide chains. *iScience*, Jul 25(7), 104516, 2022

Sukegawa M, Yoshihara T*, Hou S, Asano M, Hannan A, **Wang DO***. Behavioral impact of enriched environment, social isolation, and enrichment removal on BALB/c mice. *Eur J Neurosci*. 2022 Mar; 55(5): 1118-1140

Prakash M, Itoh Y*, Fujiwara Y, Takahashi Y, Takada Y, Mellini P, Elboray EE, Terao M, Yamashita Y, Yamamoto C, Yamaguchi T, Kotoku M, Kitao Y, Singh R, Roy R, Obika S, Oba M, **Wang DO***, and Takayoshi Suzuki*. Identification of potent and selective Fat Mass Obesity associated protein inhibitors using a fragment merging approach. *J. Med. Chem.* 64(21):15810-15824 (2021)

さらに RNA 結合タンパク質として、微小管機能と密に関連する APC タンパク質の翻訳に RNA 修飾が必要とされることを見出した。さらに、APC mRNA 上に存在する RNA 化学修飾の欠損が、微小管の動的な制御および軸索の成長に影響を与え、自閉症の分子メカニズムと関係することを見出した。その結果を bioRxiv preprint に公開した。

m6A RNA methylation-dependent APC translation is required for local translation of beta-actin and axon development. Broix L, Roy R, Oomoto I, Umeshima H, **Wang DO*** bioRxiv (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Wu Hao, Li Ying, Zhang Qian, Wang Hanxun, Xiu Wenyu, Xu Pu, Deng Yujie, Huang Wanxu, Wang Dan Ohtan | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Croceetin antagonizes parthanatos in ischemic stroke via inhibiting NOX2 and preserving mitochondrial hexokinase-I | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cell Death & Disease | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-023-05581-x | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Asamitsu Sefan, Yabuki Yasushi, Matsuo Kazuya, Kawasaki Moe, Hirose Yuki, Kashiwazaki Gengo, Chandran Anandhakumar, Bando Toshikazu, Wang Dan Ohtan, Sugiyama Hiroshi, Shioda Norifumi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPT6 in neurons | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade2035 | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Joshi Kandarp, Wang Dan O | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 epidecodeR: a functional exploration tool for epigenetic and epitranscriptomic regulation | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Briefings in Bioinformatics | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bib/bbad521 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sukegawa Momoe, Yoshihara Toru, Hou Shengqun, Asano Masahide, Hannan Anthony J., Wang Dan Ohtan | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 Long lasting housing environment manipulation and acute loss of environmental enrichment impact BALB/c mice behaviour in multiple functional domains | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1140 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15602 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Uchiyama Junki, Roy Rohini, Wang Dan Ohtan, Morikawa Kazuya, Kawahara Yuka, Iwasaki Mio, Yoshino Chiaki, Mishima Yuichiro, Ishihama Yasushi, Imami Koshi | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 pSNAP: Proteome-wide analysis of elongating nascent polypeptide chains | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 104516 ~ 104516 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104516 | 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 Yu Peng, Zhou Siting, Gao Yan, Liang Yu, Guo Wenbing, Wang Dan Ohtan, Ding Shuaiwen, Lin Shuibin, Wang Jinkai, Cun Yixian | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Dynamic Landscapes of tRNA Transcriptomes and Translatomes in Diverse Mouse Tissues | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Genomics, Proteomics & Bioinformatics | 6. 最初と最後の頁 834 ~ 849 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gpb.2022.07.006 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Joshi Kandarp, Wang Dan Ohtan, Gururajan Anand | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 The m6A-methylome in major depression: A bioinformatic analysis of publicly available datasets | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Psychiatry Research Communications | 6. 最初と最後の頁 100089 ~ 100089 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psycom.2022.100089 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Li Weiwei, Cheng Ting, Jiang Tingting, Zhou Mengyue, Gong Bowen, Zhao Guode, Li Jing, Tan Rong, Yang Xiaojing, Joshi Kandarp, Peng Ying, Cheng Maosheng, Liu Ting, Wang Dan Ohtan, Zheng Jiang | 4. 巻 365 |
| 2. 論文標題 Hepatic RNA adduction derived from metabolic activation of retrorsine in vitro and in vivo | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions | 6. 最初と最後の頁 110047 ~ 110047 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2022.110047 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Joshi Kandarp, Wang Dan Ohtan, Gururajan Anand | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 The m6A-methylome in major depression: A bioinformatic analysis of publicly available datasets | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Psychiatry Research Communications | 6. 最初と最後の頁 100089 ~ 100089 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psycom.2022.100089 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sukegawa Momoe, Yoshihara Toru, Hou Shengqun, Asano Masahide, Hannan Anthony J., Wang Dan Ohtan | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 Long lasting housing environment manipulation and acute loss of environmental enrichment impact BALB/c mice behaviour in multiple functional domains | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1140 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15602 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Prakash Muthuraj, Itoh Yukihiko, Fujiwara Yoshie, Takahashi Yukari, Takada Yuri, Mellini Paolo, Elboray Elghareeb E., Terao Mitsuhiro, Yamashita Yasunobu, Yamamoto Chika, Yamaguchi Takao, Kotoku Masayuki, Kitao Yuki, Singh Ritesh, Roy Rohini, Obika Satoshi, Oba Makoto, Wang Dan Ohtan, Suzuki Takayoshi | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Identification of Potent and Selective Inhibitors of Fat Mass Obesity-Associated Protein Using a Fragment-Merging Approach | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 15810 ~ 15824 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c01107 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 Jacque Monod Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 Jacque Monod Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 Neurochemistry Society (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 FAOP meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 46th JNS meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A RNA modification and its reader proteins at neuronal synapses |
| 3. 学会等名 2nd CJK meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A and its reader proteins at the synapses |
| 3. 学会等名 Molecular and Cellular Cognition Society Meeting (Melbourne) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Dan Ohtan Wang |
| 2. 発表標題 m6A and its reader proteins at the synapses |
| 3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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