

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26702038

研究課題名(和文) in vivo RNA Imaging Toward Mapping the Dynamics of Gene Expression in the Plastic Brain

研究課題名(英文) in vivo RNA Imaging Toward Mapping the Dynamics of Gene Expression in the Plastic Brain

研究代表者

王丹(Wang, Dan Ohtan)

京都大学・高等研究院・特定拠点准教授

研究者番号：50615482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：本支援では in vivo RNAイメージングで長期記憶形成の分子基盤を明らかにすることを目標にした。その成果として本来不可能であった計測イメージング技術に消光型プローブの導入によって、RNA分子のダイナミクスを生体内の1細胞レベルで観察しまた多細胞での同時計測をする技術が可能になった(NAR, 2015)。さらに、神経細胞における転写因子が産物がマイクロRNAに抑制されないための細胞メカニズムを果たす分子経路の存在を明らかにした(Front Mol. Neurosci, 2017)。シナプス形成と機能を制御する新しい転写後制御層を開拓した(Nat Neurosci, in press)。

研究成果の概要(英文)：With this support, we aimed to study the dynamics of RNA and their regulation as the molecular basis of long-term memory. By introducing a hybridization-sensitive fluorescent probe into intact animals and taking measurement which was previously impossible, we succeeded in visualizing RNA molecules at the level of single cells in vivo and to measure simultaneous changes in hundreds of cells (NAR, 2015). Furthermore, we discovered a novel mechanism of neuronal transcription factors that is not only required for gene activation but for suppressing the function of cognate microRNA. As the result, this mechanism prevents the functionally related gene products from being degraded (Front Mol. Neurosci, 2017). Finally, we defined a new layer of post-transcriptional regulation at neuronal synapses that are enriched in neurodevelopment and neuropsychiatric pathways (Nat Neurosci, in press) .

研究分野：neuroscience

キーワード：RNA imaging synapse neurodevelopment

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現による神経機能調節は、脳の発達や学習・記憶形成などに必須なメカニズムである。これまでに、脳の記憶関与部位における神経活動に伴って急速に発現量が変化する mRNA や noncoding RNA が数多く報告されてきた。しかし、従来の RNA ライブイメージング法では、組織内の生細胞における目的 RNA の可視化が困難であり、RNA が体内でどのように振る舞い、どのように神経機能調節を行うか明らかにできず、「RNA」と「記憶」の間には大きなギャップが存在している。従来の研究は mRNA が中心であったが、タンパク質をコードする遺伝子がゲノムのたった2%に過ぎないことが明らかになり、noncoding RNA など探索可能な RNA の範囲が飛躍的に広がったことから、脳内における様々な RNA の時空間動態について注目が集まっている。

申請者らは、世界にさきがけてシナプスでの翻訳および長期記憶形成をイメージングし、遺伝子情報を活用した記憶情報の時・空間制御が重要かつ可能なことを示した(Wang et al., *Science*, 2009; Wang et al., *TINS*, 2010)。しかし、当時は生体内 (*in vivo*) での従来の RNA イメージング実験手法に制約され、各種神経細胞及び特定の神経結合における応答遺伝子の役割をシステムレベルでの機能解明に結びつけることが困難であり、新規イメージング技術基盤の開発が急務であった。そのために、申請者らは、「生きた」脳で「1細胞」での RNA の振舞いを観察することを目指し、核酸化学者との共同研究により新規 RNA イメージング法を開発した(Wang et al. *RNA*, 2012; Ikeda, Wang et al. *ChemBioChem*, 2011, etc.)。本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、「*in vivo* RNA imaging toward mapping the dynamics of gene expression in the plastic brain」を目指した。

2. 研究の目的

本支援では、「*in vivo* RNA イメージング」の基盤技術を開発し、学習過程でおきる脳内 RNA の時空間動態をリアルタイムで定量的・動的に計測することによって、学習とゲノム発現の関連性を明らかにし、長期記憶や脳の可塑性における分子作動機構を解明することを目的とした。この研究は「学習」と「ゲノム」の相互作用によって長期記憶や脳の個性などが形成される仕組みの解明に直結する。

3. 研究の方法

脳内 RNA の時空間動態をリアルタイムで定量的・動的に計測するために、本研究ではマウス動物モデルを用いて、網羅的な分子的解析および蛍光イメージングを行った。

4. 研究成果

4-1. 世界初、細胞内に含まれる RNA(リボ核酸)を生きたままの動物脳にプローブを導入し脳組織における RNA の振る舞いを観察することに成功した。

報告者らは、簡便な1細胞レベルでの RNA 検出法を確立し、点灯型蛍光プローブを活用したマウス組織での RNA ライブイメージング法の確立に成功した。本研究では、シナプス可塑性を引き起こす学習における RNA ダイナミクスのモニターリングに資する *in vivo* 条件、高解像度、ハイスピードの検出にフォーカスして、神経活動とゲノム発現を繋ぐデータ観察を可能にする RNA 蛍光計測イメージング法を目指した。その結果、生体内へ直接 RNA ラベルを導入した蛍光イメージング法を開発し、本来不可能であった計測を新しいイメージング技術の樹立によって可能にした。その結果、ディッシュ内の細胞と生体組織内の細胞における RNA 反応ダイナミクスの違いを定性的に示した(Oomoto et al., *NAR*, 2015)。

本支援で消光型プローブの導入によって、様々な試行錯誤を重ねて新しい蛍光イメ

ーシング法を確立でき、RNA 分子のダイナミクスを生体内の1細胞レベルで観察し、また多細胞での同時計測 (collective dynamics) 技術の可能性を示した。

4-2. mRNA の時空間発現に重要である新しい抑制/活性化メカニズムを発見した。

これまでに報告者は、遺伝子情報発現の時空間制御には翻訳抑制メカニズムが重要な役割を果たすことを提唱してきた (Wang et al., TINS, 2010)。mRNA の翻訳抑制にはマイクロ RNA を介したターゲット特異的機構が報告され、転写制御からは独立して、順番に行われるメカニズム (transcriptional regulation and post-transcriptional regulation) として認識されてきた。本研究では、オーストラリア Newcastle University の Murray Cairns 教授らとの共同研究によって、転写因子 MAZ が mRNA 転写開始を制御するとともに、配列相同性による転写された mRNA をターゲットにするマイクロ RNA の生合成を阻害する新しい制御経路を見つけ出した。つまり、転写された産物がマイクロ RNA に抑制されないための細胞メカニズムを転写因子が二つの役割を同時に果たすメカニズムで実現する分子経路の存在を証明した。さらに、ヒト神経芽腫細胞を用いて、この経路が神経細胞分化に大きく寄与することを示した (Goldie et al., Front Mol Neurosci, 2017)。

4-3. 化学修飾による遺伝子発現の時空間制御新様相の発見

本研究支援では学習による遺伝子発現の時空間制御に注目して、イメージング手法の開発を実施したとともに、RNA 化学修飾による神経細胞における遺伝子発現の時空間制御に注目して、成体マウス脳のシナプスにおける RNA の m⁶A 化学修飾を定量的に検出し、神経細胞における機能を探索してきた。その結果、m⁶A-mRNA が多種類神経シナプスに存在することや、局在翻訳を制御し、シ

ナプス形成および伝達経路に必須であることを示すデータが得られた。本研究の成果に基づいて、「RNA 化学修飾」を介した地方分権型遺伝子情報発現制御メカニズムを新たに提案した。

以上の研究成果から、本支援では RNA 蛍光イメージング技術開発が進み、RNA 修飾やマイクロ RNA を介した遺伝子情報発現の制御メカニズムについて新たな知見を得ることができた。転写後制御によるタンパク質の合成制御は、非常に多彩なメカニズムが存在することが明らかになった。今後は「環境」-「ゲノム」の相互作用による神経回路可塑性のメカニズムの全貌解明を目指して研究手法開発や解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Merkurjev D, Hong WT, Iida K, Goldie BJ, Yamaguchi H, Oomoto I, Ohara T, Kawaguchi S, Hirano T, Martin KC, Pellegrini M, Wang DO*. Synaptic N6 methyladenosine (m⁶A) reveals functional partitioning of localized transcripts. (Nat Neurosci, in press)
2. Goldie BJ, Fitzsimmons C, Weidenhofer J, Atkins JR, Wang DO, and Cairns MJ. miRNA enriched in human neuroblast nuclei bind the MAZ transcription factor and their precursors contain the MAZ consensus motif. Front. Mol. Neurosci. 2017 doi: 10.3389/fnmol.2017.00259
3. Oomoto I, Hirano-Suzuki A, Umeshima H, Han YW, Yanagisawa H, Carlton P, Harada Y, Kengaku M, Okamoto A, Shimogori T, and Wang DO*. ECHO-liveFISH: in vivo RNA Labeling Reveals Dynamic Regulation of Nuclear RNA Foci in Living Tissues. *Nucl Acids. Res* doi:10.1093/nar/gkv614 (2015) * This work has been featured in "Nikkei Sangyo Shimbum" and "Weekly Economist".
4. Hayashi G, Yanase M, Takeda K,

- Sakakibara D, Sakamoto R, Wang DO, Okamoto A*. Hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotide probe conjugated with a bulky module for compartment-specific mRNA monitoring in a living cell. *Bioconjug Chem*. 2015 Mar 18;26(3):412-7.
5. Wang DO*, Okamoto A. Visualization of nucleic acids with synthetic exciton-controlled fluorescent oligonucleotide probes. *Methods Mol Biol*. 2015; 1262:69-87
 6. Sato S, Watanabe M, Katsuda Y, Murata A, Wang DO, Uesugi M. Live-cell Imaging of Endogenous mRNAs with a Small Molecule. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2;54(6): 1855-8. (2015)
 7. Sanghamitra. NJM, Inaba H, Arisaka F, Wang DO, Kanamaru S, Kitagawa S and Ueno T. Plasma membrane translocation of a protein needle based on a triple-stranded β -helix motif. *Mol. BioSyst* (2014) DOI: 10.1039

〔学会発表〕(計 34 件)

1. in vivo RNA labelling reveals dynamic regulation of ribonucleic foci in living neurons. 日本生物物理学会 2017 (招待講演)
2. Synaptic epitranscriptomics and dynamic RNA imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases.. 留日中国人生命科学協会 2017 年度学術大会 2017 (招待講演) (国際学会)
3. Synaptic Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases. 兵庫県立大学国際シンポジウム 2017(招待講演) (国際学会)
4. Synaptic epitranscriptomics and dynamic RNA imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases. 第 40 回日本分子生物学会 2017 (招待講演) (国際学会)
5. Synaptic m6A Epitranscriptome Reveals Functional Partitioning of Localized Transcripts for Dynamic Tripartite Synapse Modulation. 第 19 回日本 RNA 学会(口頭発表) 2017
6. Synaptic Epitranscriptomics and

Dynamic RNA Imaging. International Symposium on Imaging Frontier(ISIF 2017) (招待講演) (国際学会) 2017

7. Real-time Imaging and Simulation Reveal Important Operation Factors for mRNP Spatial Regulation. 21st Annual Meeting of the RNA society (国際学会) 2016
8. Activity-dependent dynamics of mRNA expression and m6A methylation in human neuronal cells. 21st Annual Meeting of the RNA society (国際学会) 2016
9. Toward effective detection of activity-triggered changes in gene expression in a living brain. 第 89 回日本生化学大会 2016 (招待講演)
10. Synaptic epitranscriptomics and RNA imaging. Asian Pacific Society Neuroscience Annual Meeting 2016 (招待講演)
11. Synaptic epitranscriptomics and RNA imaging. The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan 2016 (招待講演)
12. マウス成体脳シナプスにおける m6A-RNA のトランスクリプトーム解析. 第 17 回日本 RNA 学会 2015,ポスター
13. Imaging RNA in Living Neural Circuits with Hybridization-sensitive Fluorescent Probes. Symposium on Development and Disease (国際学会) 2015
14. イメージングとシミュレーションから明らかにする RNP の出現・消失の空間作動原理. 第 17 回日本 RNA 学会 2015, ポスター
15. ECHO-liveFISH: in vivo RNA Labeling Reveals Dynamic Regulation of Nuclear RNA Foci in Living Tissues. Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter (国際学会)、ポスター

以下省略

〔図書〕(計 2 件)

1. **Wang DO***. "Live Imaging of Nuclear RNPs in Mammalian Complex Tissue with ECHO-liveFISH". *Methods in Molecular Biology*. Vol 1649,

doi.org/10.1007/978-1-4939-7213-5.

(2017)

2. 大本育実、王丹 “点灯型蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いた ncRNA の可視化。”実験医学増刊 Vol.33-No.20, 2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

王 丹(Wang, Dan Ohtan)

京都大学・高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 特定拠点准教授

研究者番号: 50615482

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

大本育実 (OOMOTO, Ikumi)

松尾直毅 (MATSUO, Naoki)

岡本晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)