

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03546

研究課題名(和文) 局所mRNAメチル化修飾による神経細胞遺伝情報「地方分権型」制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Widely spread RNA modification at neuronal synapses add functional diversity to local transcriptome

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は刻一刻変化する周囲環境に瞬時に応答できる転写後制御メカニズムとして、成長円錐およびシナプスに局在するmRNAの化学修飾の解明を目標にした。そのために、健康な成体マウス脳から神経シナプスに含まれるRNAを精製し、次世代シーケンサーで解読した。結果、シナプスにおけるm6A修飾状況を世界初記述し、精神疾患・発達障害に関連するものが多く含まれることが明らかになった。さらに、m6A修飾を読み取るYTHDF1による局所翻訳との関わりや、シナプス伝達の制御に重要であることを明らかにし、精神疾患・発達障害においてシナプスにおけるmRNAの化学修飾が関連するという全く新しい可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、m6Aをはじめ次々とmRNAの新たな修飾が網羅的に同定されるようになったが、各細胞の運命決定における意義の解明は着手されたばかりである。申請者は既存のエピジェネティクスモデルでは解決できない「迅速さ」と「柔軟性」をもつ神経遺伝子情報発現新制御相を明らかにする。応用としては、遺伝性のない神経変性疾患において、mRNA修飾制御が新たな研究対象として展開されることが期待できる。本研究成果を皮切りに、様々な化学修飾がmRNAメタ情報として、神経細胞のみならず広範な生命現象の制御因子として、より一般的な概念として波及していく効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：The brain is an intricate and complex organ that underlies our cognition and behavior. To understand how our genetic information is transformed into brain function, we have focused on RNA chemical modifications within synapses that contribute to circuitry for learning and conscious perception. Now we have revealed an unexplored regulatory mechanism of dynamic gene expression for the synthesis and modulation of tripartite synapses, and for brain pathways implicated in neurodevelopmental and neuropsychiatric diseases. This work indicates that simple chemical modifications, such as addition of a methyl group (-CH₃) to the RNA molecules, can make critical contributions to building neuronal connections in the brain and thus the emergence of individual consciousness. Future directions will be focused on how these local synaptic changes in the epitranscriptome may influence learning and conscious perception.

研究分野：神経科学

キーワード：N6-adenosine methylation 機能分画 シナプトソーム 翻訳制御 精神疾患 発達障害

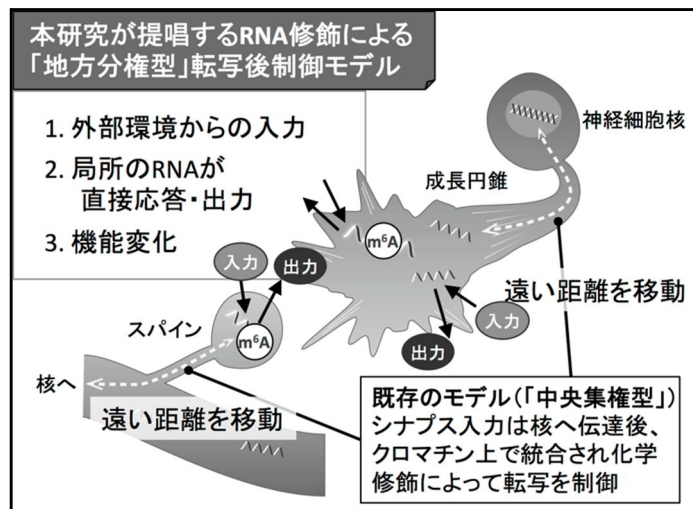
1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、機能・形態ともに脳内の情報伝達と保存に特化した細胞である。その機能を果たす最も基本的な構造であるシナプスに、**mRNA** が能動的に輸送され、記憶の保存や神経回路の再編成など多様なニーズに応じて局所的かつ選択的に翻訳されることが申請者らの研究を含め多くの先行研究によって明らかになった(Wang et al., 2009, 2010, 2012 and others)。mRNA 局在翻訳によるタンパク質の時空間分配メカニズムは、刻一刻変化する情報に瞬時に応答しなければならないにも関わらず神経細胞体から遠く離れており、転写による遺伝子情報変化に依存しにくい成長円錐やシナプスにおいて特に重要な役割を果たす。その破綻は脳の発達、成熟、老化過程における様々な疾患や病気に密接に関係する。しかし、現状では局在する mRNA がどのように様々なシグナルに作用しつつ、迅速かつ柔軟に神経活動に応答して連続的あるいは非連続的な変化を遂げるかについての知見はほとんど得られていない。既存の神経活動依存的エピジェネティクス制御モデルは、シナプスと核(クロマチン)間の遠い距離のシグナル伝達が必要とされる「中央集権型」の制御であり、迅速さと柔軟さに欠けるメカニズムである。

近年、DNA やヒストンタンパクと同様に mRNA から様々な化学修飾が同定され、細胞の運命決定および個性形成に大きく寄与する可能性が示唆されてきた(Science, 2016)。その中でも、修飾塩基 N6-メチルアデノシン (m6A) は mRNA 上のメチル化修飾のうちもっとも存在量が豊富で、環境依存的に可逆的に制御されていることが報告された (Nature, 2012, 2015, 2016; Cell, 2012, 2013; Nat Rev Mol Cell Biol 2014; Mol Cell, 2016)。また m6A 修飾は脳の中で特に豊富に生じていること、中枢神経系の機能である概日リズムの調節を行っていること、ドーパミン報酬系を制御することが報告されている (Cell, 2012, 2013; Nat Neurosci, 2013)。このように、神経細胞ならびに脳の機能に重要であることは萌芽的にわかりつつあるが、m6A の神経細胞における時空間制御や生理的意義は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

報告者はこれまでに、神経細胞の成長円錐やシナプスにおいて、局所シグナル依存的に mRNA 翻訳が促進あるいは抑制されることが明らかにしてきた。その多様性と柔軟性を生み出す microRNA による応答制御メカニズムは今までに報告されてきたが(Neuron 2010)、RNA 化学修飾についての報告はない。しかし、DNA やヒストンタンパク修飾と共通の供与体由来のメチル基を用いる m6A 修飾が、なんらかのメカニズムでエピジェネティックな制御経路と交差する可能性は十分に考えられる。報告者は、m6A 修飾が mRNA に付随する



メタ情報として、神経細胞における局所シグナル依存的な遺伝子転写後制御に寄与する重要なプレイヤーである可能性にいち早く着目し、マウス初代培養神経細胞で m6A メチル基の導入/除去/認識を司る様々なたんぱく質のノックダウンと強制発現を行った。その結果、m6A 導入/除去酵素および結合タンパクが成長円錐やシナプス近傍に局在することや、ノックダウン細胞が呈する成長円錐やスパインの構造異常から、m6A が局所的に制御され、シナプスや成長円錐の機能に寄与することが示唆された。本研究では、ヒトとマウス由来の神経細胞におけるメチル化修飾 m6A の時空間ダイナミクスを新解析技術の開発を通じて明らかにしていきたい。成功すれば、成長円錐やシナプスにおける外部入力から直接応答をアウトプットする「地方分権型」新制御相を確立し、神経細胞における特徴的な高い時空間分解能をもつ環境依存的遺伝子情報発現プログラムを実現する分子メカニズムを明らかにできる。そのために、1.RNA 化学修飾がどのように局在化されているか、2.神経活動にどのように応答するかを検証しなければならない(上図)。

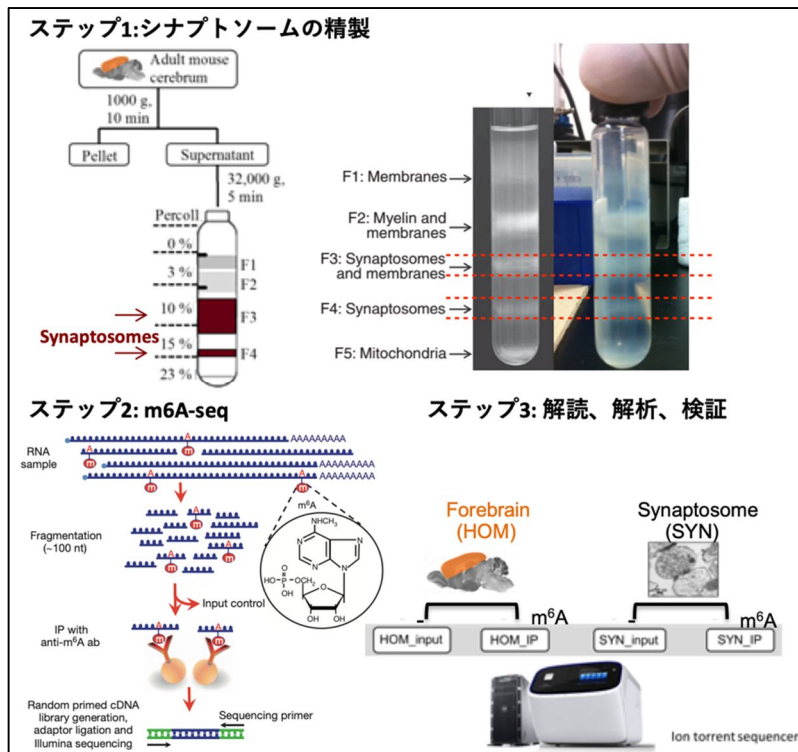
3. 研究の方法

本研究では、成長円錐やシナプスにおける mRNA のメチル化修飾の全体像を掴むために、微量な RNA を用いた Low-Input m6A-Seq の手法を開発した。これを用い以下の方法で研究を行った。

1. 神経細胞の特徴的な構造であるシナプスや成長円錐への空間的配置成体脳シナプスに局在する m6A 修飾の全貌を明らかにするとともに、これの特徴を捉えるために、シナプトソームを

対象に Low-Input m6A-Seq を行った (方法図 1)。

方法図 1:



2. 「RNA 修飾 遺伝子発現制御 神経細胞機能変化と活動応答性」における「地方分権型」m6A の局在化制御の分子環境と構築メカニズムを解明する目的で、m6A 制御タンパク質をノックダウンした初代培養細胞を対象に、成長円錐およびスパインにおける形態異常の表現型の解析を行った (方法図 2)。

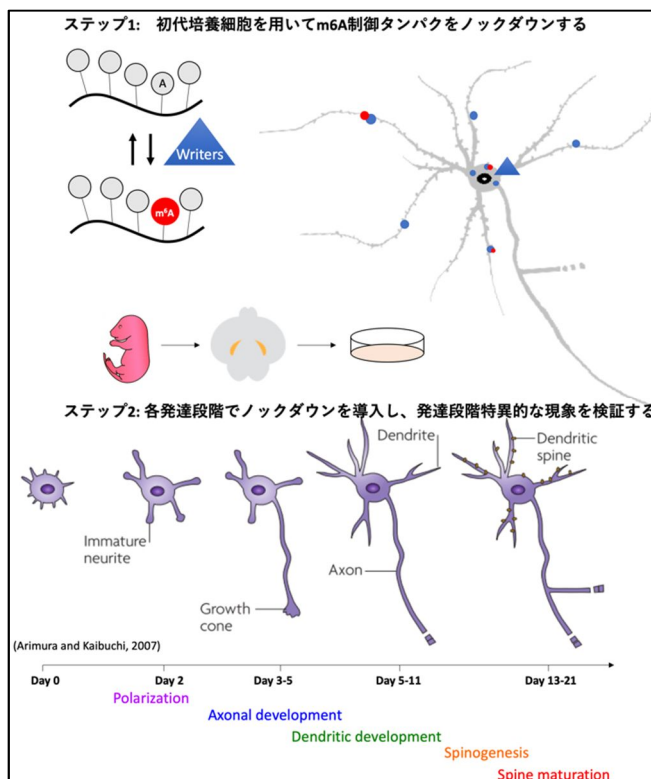
4. 研究成果

本研究のより、以下に列記する一連の成果が得られた。

(1) 本研究により開発された Low-Input m6A-Seq の手法はそれ自体が重要な研究手法であり、成果に位置づけられる。この手法に

より、シナプスに存在するような微量な RNA をスタートマテリアルとして、m6A 修飾プロファイルを取得することが可能となった。本手法では、RNA を増幅するステップを取り入れ、蛍光による RNA 定量を行うことによって ng オーダー以下の RNA、つまり従来の m6A-seq 手法に必要なとされる RNA 量の 1/25-1/50 の量で解析を行うことを可能としている。

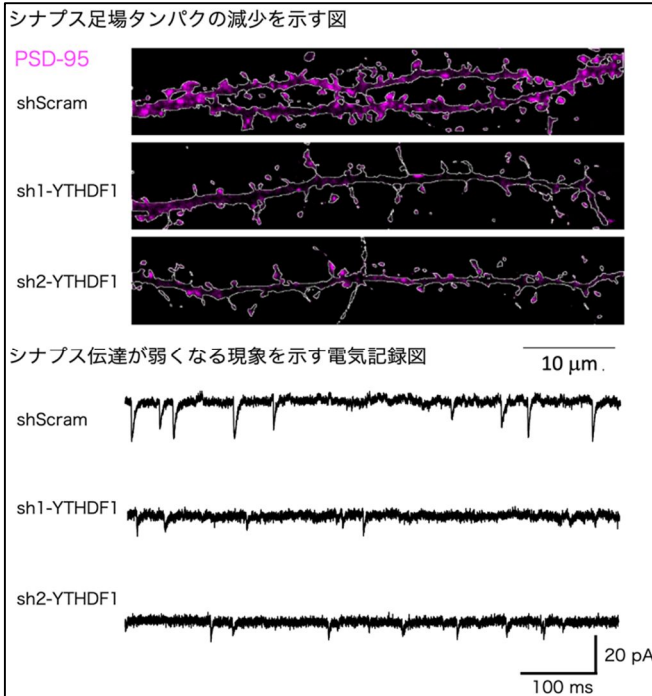
方法図 2:



(2) 新しく開発した手法を用いることによって、シナプスに局在した N6-methyl-adenosine (m6A)-RNA の網羅的解析に世界で初めて成功した。同時に行った脳全体を対象とした解析では、微量の RNA からの解析であるにもかかわらず、既報と高い一致度で m6A 塩基の存在位置を特定できることを確認し、Low-Input m6A-Seq の有用性を示すことができた。シナプス由来の RNA からは 9,323 遺伝子に 16,539 力所の m6A 修飾の位置を同定することができた。このうち約 18% が脳全体の m6A 解析では観察されない、すなわちシナプス特異的な m6A 修飾であった。シナプス特異的な m6A 修飾が観察される状況としては以下の二通りが想定される。一つは、シナプスでの mRNA 量が脳全体量に対して増加しそれに伴い m6A 修飾を受ける塩基も増加しているケース、もう一つは遺伝子発現量とは独立に特異的な m6A 修飾が生じているケースである。これらを区別するため、シナプス特異的な m6A 修飾がみられた遺伝子と、シナプスで転写量が増加している遺伝子の

比較解析を行った。この結果、後者に該当する 1,266 個の遺伝子を同定することができ、シナプスにおける特異的な m6A 修飾の一端を明らかにすることに成功した。

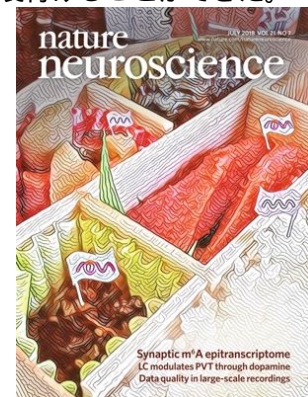
(3) m6A 修飾を受ける RNA 群と、受けていない RNA 群と比較することによって、これらがコードするたんぱく質の機能に分離がみられることを明らかにした。m6A 修飾を受ける RNA 群において



における m6A 修飾の全貌を世界で初めて記述し、それを読み取る分子である YTHDF1 タンパク質による局所翻訳との関連性や、シナプス伝達における重要性を明らかにし、精神疾患および発達障害において、シナプスにおける mRNA の化学修飾が関連するという全く新しい可能性を示した。この結果は Nature Neuroscience 誌に発表され、掲載号の表紙を飾った (Merkurjev et al. 2018, 右図)。

は、シナプスの構造および機能を制御するたんぱく質をコードする RNA が統計的に有意に濃縮されており、精神疾患・発達障害の関連遺伝子が多く含まれていた。さらに、シナプスにおける m6A 修飾の役割を確かめるために m6A 修飾塩基を読み取る分子である YTHDF1 の機能を阻害した海馬神経細胞での解析を行った。この結果、シナプス特異的な m6A 修飾を受ける mRNA の 1 つである Apc mRNA の局在の変化や樹状突起の形態の変化、シナプスにおける足場タンパク質の減少、シナプス伝達の減弱が観察された (左図)。また変化した樹状突起の形状は、発達障害をもつ人の樹状突起の形状と似ており、m6A 修飾の神経細胞における重要性を裏付けることができた。

以上の成果をまとめると、我々は、シナプスに



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang D0, Ninomiya K, Mori C, Koyama A, Haan M, Kitabatake M, Hagiwara M, Chida K, Takahashi SI, Ohno M, Kataoka N	4. 巻 4
2. 論文標題 Transport Granules Bound with Nuclear Cap Binding Protein and Exon Junction Complex Are Associated with Microtubules and Spatially Separated from eIF4E Granules and P Bodies in Human Neuronal Processes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389	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 Belinda J. Goldie, Chantel Fitzsimmons, Judith Weidenhofer, Joshua R. Atkins, Dan O. Wang, and Murray J. Cairns	4. 巻 10
2. 論文標題 miRNA Enriched in Human Neuroblast Nuclei Bind the MAZ Transcription Factor and Their Precursors Contain the MAZ Consensus Motif	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389	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 Merkurjev D, Hong WT, Iida K, Goldie BJ, Yamaguti H, Oomoto I, Ohara T, Kawaguchi S, Hirano T, Martin KC, Pellegrini M, Wang D0*	4. 巻 21
2. 論文標題 Synaptic N6 methyladenosine (m6A) reveals functional partitioning of localized transcripts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1004-1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-018-0173-6	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 該当する
1. 著者名 飯田慶、王 丹*	4. 巻 36(19)
2. 論文標題 RNAメチル化によるシナプスでの遺伝子機能分画	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3227-3231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Roy R, Shiina N*, Wang DO*	4. 巻 168
2. 論文標題 More dynamic, more quantitative, unexpectedly intricate: advanced understanding on synaptic RNA localization in learning and memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Learn and Mem	6. 最初と最後の頁 107149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nlm.2019.107149	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 助川桃枝・王 丹*	4. 巻 269(10)
2. 論文標題 RNA 化学修飾と精神疾患 - 神経シナプスからの理解	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学の歩み	6. 最初と最後の頁 811-812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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22件 (うち招待講演 21件 / うち国際学会 19件)

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 Synaptic epitranscriptomics and dynamic RNA imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases.
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 Synaptic Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases.
3. 学会等名 兵庫県立大学国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 Synaptic epitranscriptomics and dynamic RNA imaging in neurodevelopmentle and neuropsychiatric diseases.
3. 学会等名 留日中国人生命科学協会2017年度学术大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 生きた脳組織にRNA計測イメージングの開発
3. 学会等名 アミロイド病態代謝研究会第48回研究報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 in vivo RNA labelling reveals dynamic regulation of ribonucleic foci in living neurons
3. 学会等名 日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 Synaptic m6A Epitranscriptome Reveals Functional Partitioning of Localized Transcripts for Dynamic Tripartite Synapse Modulation
3. 学会等名 第19回日本RNA学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王丹
2. 発表標題 Synaptic Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging
3. 学会等名 International Symposium on Imaging Frontier(ISIF 2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Emerging Neuropitranscriptomics
3. 学会等名 2nd SPIRITS International Symposium, The 3rd National Festival and International Congress on Stem Cell and Regenerative Medicine, LSACJ Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Synaptic Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging
3. 学会等名 EMBO symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Emerging Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging
3. 学会等名 Annual symposium at NIPS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Chemistry and Biology Connected for the Emergence of Consciousness
3. 学会等名 24th iCeMS international symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Spatiotemporal Regulation of Gene Expression in Neurons
3. 学会等名 iCeMS-iTHEMS joint workshop on Interdisciplinary Biology, Kyoto University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Synaptic m6A epitranscriptome reveals functional partition
3. 学会等名 JNS Kobe (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 シナプスとmRNAの化学修飾
3. 学会等名 Symposium "Open Innovation and Drug Discovery" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Emerging Epitranscriptomics and Dynamic RNA Imaging
3. 学会等名 Queenstown Molecular Biology Meetings in Shanghai (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Emerging Epitranscriptomics in the Synapses
3. 学会等名 Indian Academy of Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Emerging Neuropitranscriptomics
3. 学会等名 2019 Tzu Chi-Academia Sinica Biomedical Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Dynamic RNA Imaging
3. 学会等名 Australasian Neuroscience Society meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 RNA Epigenetics in Neurons and Synapses
3. 学会等名 生理研研究会「記憶研究会」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Synaptic Epitranscriptomics and Dynamic RNA imaging
3. 学会等名 EBPS Biennial Meeting (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 RNA modifications and translational regulation at neuronal synapses
3. 学会等名 ISN-ASN (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang D0 et al
2. 発表標題 Epitranscriptomics in Synapses
3. 学会等名 NEURO2019, Asian Chemical Biology Initiative 2019 Yangon Meeting (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wang, Dan Ohtan	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 489
3. 書名 RNA Detection	

〔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 分担者	飯田 慶 (Iida Kei) (00387961)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	