

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04603

研究課題名(和文)種特異的ノンコーディングRNAによるほ乳類脳神経機能の分化

研究課題名(英文)Species-dependent neural function organized by non-coding RNAs

研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90390682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類脳の基礎研究の大多数にはマウスが活用されてきた。しかし、霊長類の脳とげっ歯類の脳は大きく異なっており、その分子基盤を明らかにすることはモデル動物を用いた研究を医学・獣医学・畜産学の実際に結ぶために必須である。本研究では、ゲノムにコードされる遺伝情報のうち、タンパクになれない非コードRNA(ncRNA)セットが種間多様度が高いことに着目し、そのデータベースを5動物種について構築することに成功した。また、脳の種多様化の根幹をなすと考えられる神経幹細胞に着目し、その細胞動態を変化させる多数のncRNAの機能を同定した。

研究成果の概要(英文)：Vast majority of the fundamental research projects on the mammalian brain utilize the mouse systems. However, morphological and functional differences between primates and rodents evidently exist, and therefore, the molecules that underlie the generation of the differences need be identified. In this study, focusing on the promoter-associated non-coding RNAs (pancRNAs), the comprehensive databases have been made for 5 different mammalian species. Now functional pancRNAs are being screened, that potentially differentiate the neural stem cell behaviors depending on species.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：種特異的 転写因子 ノンコーディングRNA DNA脱メチル化 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脳の形態学的・機能的な違いは遺伝的に98%の相同性を示すヒト・サルでも明らかであり、実験動物として汎用されるマウスも、殆どの遺伝子セットを共通に利用しながら、独特な神経系を獲得している。獣医・畜産学分野では、様々なほ乳動物を包括的に理解することが常に求められる。しかし種を超えた「保存性」と「多様性」を必然的に内包した本分野においても、生物多様性を分子メカニズムから記述する研究は未だ黎明期にあると言わざるをえない。霊長類特異的なDNA配列の欠失が進化分岐において一定の役割を担ってきたことが示唆されていたが、種特異的な分子をどの程度進化の過程で獲得してきたのか、また、獲得した分子にはどのような機能的意義があるのか、は不明のままであった。

2. 研究の目的

ゲノムにコードされる遺伝情報のうち、タンパクになれない非コードRNA(ncRNA)セットは種間多様度が高い。そこで、本課題では、偽遺伝子挿入あるいは塩基置換によるncRNA獲得と機能が、既存のタンパク質をコードする遺伝子の発現スイッチを多様化する、という独自の発見を発展させることにした。特に、種特異的な長鎖ncRNA群を介した脳遺伝子発現活性化機構に着目し、核内のncRNA機能性を、バイオインフォマティクス技術とDNA操作実験を駆使することで検定することにした。

3. 研究の方法

i) チンパンジー・マカク・マーモセット・マウス・ラット組織の全ゲノムレベル遺伝子発現(トランスクリプトーム)解析により、各動物種毎にncRNAデータベースを作製した。ii) 脳の種多様化の根幹をなすと考えられる神経幹細胞動態に着目し、その可視化トランスジェニックマウスを活用することとした。FACSによる細胞選別後にトランスクリプトームを取得した。加えて、細胞の遺伝子発現能を制御するDNAメチル化について、全ゲノムレベル情報も取得した。iii) マウスについては、実際にゲノム上の遺伝子発現をON/OFFするために重要な52の転写因子について、全ゲノム結合情報を取得した。iv) データベース化したncRNAの機能検定には、神経幹細胞を標的として、種特異的なncRNAのノックダウン実験、CRISPR-Cas9システムによるノックイン実験を行った。

4. 研究成果

まず、i) 5動物種(3霊長類、2げっ歯類)の計25組織のトランスクリプトームを解析し、エピゲノムデータと照合することでプロ

モーターncRNAによるエピゲノム形成機序を示すことに成功した。ii) げっ歯類と霊長類の多能性幹細胞から神経幹細胞に分化する過程におけるトランスクリプトーム変化の同定に成功した。また、げっ歯類においては、iii) 神経幹細胞が発達に伴い変化するメカニズムに関与する重要転写因子群を同定した。さらに、この成果を基礎として、iv) 神経幹細胞における機能転写因子の発現を制御する霊長類特異的なncRNAを同定し、機能解析を進行した。

i) については、代表的な遺伝子活性化型エピゲノム修飾として知られるヒストンH3の4番目リジンのトリメチル化(H3K4me3)とH3K27のアセチル化(H3K27ac)は脳から発現するプロモーターncRNA(pancRNA)群の発現と正に相関していた。興味深いことに、H3K4me1はpancRNAを有する遺伝子プロモーターにはpancRNAの発現状態に無関係に認められ、ゲノム配列にGあるいはCが偏在した構造が認められた。一方でpancRNAを欠く遺伝子プロモーターでは調べた全ての組織において低レベルに推移し、GCの偏在は認められないことを発見した。したがって、種特異的なpancRNAの潜在能力はGCのバイアス獲得を基礎としてH3K4me1にて識別されていると考えられた。

ii) iii) については、新学術領域研究「先進ゲノム支援」のサポートを得て、マウス・チンパンジーに共通して存在し、且つ、時間経過とともに発現変化する重要転写因子群に着目することで、神経幹細胞を基点とした神経回路形成のためのゲノム修飾プロセスが、以下の3つのステップから成り立っていることを明らかにした：I. 多能性幹細胞から誘導された神経幹細胞からは、先ずニューロンのみが優先的に産生されるが、このとき、ゲノムDNAにおけるSox2・Sox21・Ascl1の結合とDNA脱メチル化が強く結びついて起こる。II. 次に、神経幹細胞は、Nuclear factor I(NFI)によるDNA脱メチル化の誘導により、ゲノム全体にわたる制御を一新し、神経幹細胞が産み出す細胞を、アストロサイトやオリゴデンドロサイトを生み出せる状態に移行させる。III. 一旦アストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化した細胞では、ニューロンで機能する遺伝子発現制御領域を再メチル化し強制的にOFFにすることで、アストロサイトやオリゴデンドロサイトから別の細胞、すなわちニューロンへと再分化されないように固定される。

iv) については、i) ii) iii) の情報を基礎として、神経幹細胞がニューロン・アストロサイトを産生するタイミングを改変する重要遺伝子群から、霊長類特異的なncRNAをスクリーニングし、現在げっ歯類細胞への賦与することによる形質変化を多数調べている

ところである。

i) ii) iii) の一部については、論文として採択され(雑誌論文 1, 5, 6)、iv) についても一部投稿準備中である。

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)

*: 研究代表者が責任著者

1. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) expression in PC12 cells. Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura*. *Nucleic Acids Research*, 44: 5105 (2016) <http://nar.oxfordjournals.org/content/44/11/5105> (open access) (査読あり)

2. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. Orié Hikabe, Nobuhiko Hamazaki, Go Nagamatsu, Yayoi Obata, Yuji Hirao, Norio Hamada, So Shimamoto, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima, Mitinori Saitou, Katsuhiko Hayashi. *Nature*, 539: 299 (2016) (査読あり)

3. Manipulation of promoter-associated noncoding RNAs in mouse early embryos for controlling sequence-specific epigenetic status. Nobuhiko Hamazaki, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura*. *Methods in Molecular Biology*, 1543: 271 (2017) (査読あり)

4. Detection of bidirectional promoter-derived lncRNAs from small-scale samples using pre-amplification-free directional RNA-seq method. Nobuhiko Hamazaki, Kinichi Nakashima, Katsuhiko Hayashi, Takuya Imamura*. *Methods in Molecular Biology*, 1605: 83 (2017) (査読あり)

5. Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals. Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Takao Oishi, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura*. *BMC Genomics*, 18:285 (2017) <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3662-1> (open access) (査読あり)

6. DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multilineage competence in neural stem/progenitor cells. Tsukasa Sanosaka#, Takuya Imamura#*, Nobuhiko Hamazaki, MuhChyi Chai, Katsuhide Igarashi, Maky Ideta-Otsuka, Fumihito Miura, Takashi Ito, Nobuyuki Fujii, Kazuho Ikeo, Kinichi Nakashima. *Cell Reports*, 20:2992 (2017) [http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(17\)31228-7](http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(17)31228-7) (open access) (#equal contribution) (査読あり)

7. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. Tomonori Kameda, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima. *Cell and Tissue Research*, 371:189 (2018) (査読あり)

[学会発表] (計 26 件)

1. Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura : Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNA may contribute to the diversification of gene expression profile. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年

2. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura : Promoter-associated noncoding RNAs mediate gene-specific DNA demethylation for mouse preimplantation development. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年

3. Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura : Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNAs epigenetically regulate irreversible differentiation of PC12 cells. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年

4. 今村拓也、濱崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一 : 雌性発生胚を活用した Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法によるマウス DNA メチローム解析 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年

5. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura : Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse

preimplantation development.
第 48 回日本発生生物学会年会 (2015
JSDB-APDBN meeting) (国際学会) 2015 年

6. Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima,
Kiyokazu Agata, Takuya Imamura :
Species-specific repertoires of
promoter-associated non-coding RNA may
contribute to the diversification of gene
expression profile.
第 48 回日本発生生物学会年会 (2015
JSDB-APDBN meeting) (国際学会) 2015 年

7. Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka,
Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya
Imamura : Bidirectional promoter-derived
antisense noncoding RNAs epigenetically
regulate irreversible differentiation of
PC12 cells.
第 38 回日本神経科学大会 2015 年

8. 今村拓也、濱崎伸彦、上坂将弘、阿形清
和、中島欽一 : 雌性発生胚を活用した
Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法によるマ
ウス DNA メチローム解析
第 108 回日本繁殖生物学会大会 2015 年

9. 小野田孝太、佐藤弘明、浜崎伸彦、中嶋
秀行、東村博子、前多敬一郎、中島欽一、今
村拓也 : マウス性的二型核内の細胞でみられ
るアンドロジェン依存的な DNA メチル化
レベルの変化
第 10 回日本エピジェネティクス研究会
2016 年

10. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、木村文
香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス
胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおける
神経活動依存的 DNA メチローム変動の検
出
第 10 回日本エピジェネティクス研究会
2016 年

11. 今村拓也、山本直樹、阿形清和、中島欽
一 : cAMP シグナルによる PC12 細胞の最終分
化機構には両方向性プロモーター由来のノ
ンコーディング RNA (pancRNA) 発現制御が必
須である
第 10 回日本エピジェネティクス研究会
2016 年

12. 山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓
也 : Regulation of Non-coding RNA
Contributes to the Complete Cessation of
Cell Proliferation of Neuron-like Cells
第 35 回札幌国際がんシンポジウム (国際学
会) 2016 年

13. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、木村文
香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス

胎仔海馬由来初代培養ニューロンにおける
神経活動依存的 DNA メチローム変動の
検出
第 35 回札幌国際がんシンポジウム (国際学
会) 2016 年

14. 山本直樹、阿形清和、中島欽一、今村拓
也 : 長鎖ノンコーディング RNA はほ乳類ニ
ューロン完全増殖停止に必須である
第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016 年

15. Takuya Imamura, Naoki Yamamoto,
Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima :
Regulation of non-coding RNA contributes
to the complete cessation of cell
proliferation of neuron-like cells.
Society for Neuroscience 2016, San Diego
Convention Center (国際学会) 2016 年

16. 藤本雄一、亀田朋典、小野田孝太、吉良
潤一、中島欽一、今村拓也 : ヒト ES/iPS 細
胞から神経幹細胞への誘導とその分化過程
におけるノンコーディング RNA (pancRNA)
を介した特異的遺伝子活性化
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

17. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、木村文
香、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス
海馬ニューロンにおいて神経活動により D
NA 化が変動し遺伝子発現応答能を改変す
る
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

18. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、三浦史
仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス海馬ニュー
ロンは神経活動依存的に DNA メチロームを
変動し、脱メチル化を介して遺伝子発現
を高速化する
第 11 回日本エピジェネティクス研究会
2017 年

19. 今村拓也、山本直樹、阿形清和、中島欽
一 : Regulation of non-coding RNA
contributes to the complete cessation of
cell proliferation of neuron-like cells
第 43 回内藤コンファレンス (国際学会)
2017 年

20. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、三浦史
仁、伊藤隆司、中島欽一 : Neuronal
activity-dependent DNA methylation
changes in the naive hippocampal neurons
accelerate gene expression responses to
the following stimuli
The 72nd Fujihara Seminar Molecular
Mechanism of Molding and Disruption of the
Epigenomes Underlying Cellular Community
(国際学会) 2017 年

21. 本田瑞季、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一：Mechanism underlying developmental stage dependent changes in neural stem cells responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins
The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (国際学会) 2017年

22. 今村拓也、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一：DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multi-lineage competence in neural stem/progenitor cells
The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (国際学会) 2017年

23. 今村拓也、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一：DNA methylomes identify transcription factor-based epigenomic signatures for timed acquisition of differentiation competence in neural stem/progenitor cells towards neuronal and glia lineages
4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会) 2017年

24. 今村拓也：ニューロンにおけるエピゲノム制御とその破綻
第44回日本毒性学会学術大会 2017年

25. Takuya IMAMURA：Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells
France Japan Epigenetics Workshop 2017 (国際学会) 2017年

26. 今村拓也：長鎖 ncRNA によるほ乳類エピゲノム制御
ConBio2017 2017年

〔図書〕(計2件)

1. 今村拓也
R+rGADEM：「次世代シーケンサーDRY 解析教本」清水厚志、坊農秀雅(編集) 2015年

2. 亀田朋典、中島欽一、今村拓也
lncRNA の進化と種特異性：「ノンコーディング RNA -RNA 分子の全体像を俯瞰する-」廣瀬哲郎、泊幸秀(編集) 2016年

〔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〕

研究代表者ホームページ

<http://scb.wp.med.kyushu-u.ac.jp/imamura/>

ノンコーディング RNA による神経モデル細胞が増えない仕組みの発見(九州大学プレスリリース)

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/3>

ほ乳類神経幹細胞が変化するメカニズムを明らかに(九州大学プレスリリース)

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/171>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, Takuya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90390682

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()