

出國報告（出國類別：開會）

參加基石研討會之 RNA 修飾與健康和 疾病國際會議及論文壁報發表

服務機關：臺北榮民總醫院 醫學研究部 轉譯研究科

姓名職稱：鄧元淇 契約高級助理研究員

派赴國家/地區：加拿大 班夫

出國期間：112 年 12 月 11-15 日

報告日期：113 年 1 月 4 日

摘要

鄧元淇助理研究員於民國 112 年 12 月 11-15 日參加在加拿大班夫舉辦的基石研討會 (Keystone symposia)，主題為「RNA 修飾與健康和疾病 (RNA modifications in health and diseases)」國際會議。此行受到國科會補助以吸取執行計畫所需要的新知。大會講題有 RNA 修飾與免疫、RNA 修飾之分子機轉、研究 RNA 修飾之新實驗技術、RNA 修飾在發育與疾病、RNA 修飾與癌症、RNA 修飾在工業應用、RNA 修飾與治療、非轉譯 RNA 之修飾。職目前的研究待建立偵測單點定量的 m6A RNA 修飾，此次在演講聽到可立即應用的 GLORI 法，並在海報時間向專家交流使用第三代奈米孔定序的新套組和偵測 m6A RNA 修飾位點之新程式，職將以上新知應用至研究和計畫申請。此次會議中，職以海報形式發表自己初步研究「RNA 修飾在視網膜發育中扮演關鍵角色」為題。

目次

封面 (1)

摘要 (2)

目次 (3)

目的 (4)

過程 (4-10)

一、m6A 相關重點演講 (4-6)

二、m6A 相關重點海報展示 (7)

三、職的研究報告 (7-8)

四、潛在合作對象 (9)

心得與建議 (9-10)

目的

職目前研究課題為 RNA 修飾與視網膜神經發育。初步結果獲得國科會個人型計畫之支持，同時獲得國外差旅費可以參加國際會議。職目前正在努力建立偵測單點 m6A 甲基化程度的次世代定序，其中包含新一代的奈米孔定序與其分析程式。基石研討會所舉辦的主題「RNA 修飾與健康和疾病」囊括職所希望攝取的新知：RNA 修飾之分子機轉、研究 RNA 修飾之新實驗技術和 RNA 修飾在發育與疾病。職希望能透過參加此會議獲得最新的知識，更希望能學習更多有關奈米孔在直接定序 RNA 之知識與分析方法，並透過會議中的交流獲得學習與合作的對象。

過程

重要議程分為三大場。第一場主要探討免疫與相關分子機制、和新穎的分析方法。第二場主要探討發育與癌症。第三場探討工業和醫療應用與非轉譯 RNA。



m6A 相關重點演講：

1. Exon junction complexes and exon architecture control m6A methylation and gene expression

「外顯子交界複合物和外顯子結構控制 m6A 甲基化和基因表達」

發表實驗室：Chuan He

N6-甲基腺苷 (m6A) 的修飾是有差異性的，修飾傾向發生在某種序列裡，但卻不是每一個這樣的序列都被 m6A 修飾，這種差異一直未能被解釋。研究發現在 m6A 修飾常出現在 (一) 長的內部外顯子和 (二) 停止密碼子的區域中。RNA 表達量會被 m6A 讀取蛋白選擇性地結合 RNA 的 m6A 這個機制所調控的。此實驗室開發 MPm6A 方法來系統地探討影響 m6A 特異性的決定因子。他們發現，外顯子交界複合物 (exon junction complexes) 能保護外顯子交界附近的 RNA 不被甲基化，這種由剪接體 (spliceosome) 選擇性的抑制甲基化與外顯子的長度有關，並且其分子機制為外顯子交界複合物能包裹並壓縮 RNA 結構，使 m6A 甲基轉移酶複合物

無法接近 RNA。因此，這樣的機制使得較長的外顯子和最後一個外顯子較不容易被甲基化。他們結論外顯子交界複合物能抑制 m6A 甲基化，所以能差異性地控制 m6A 甲基化，揭露 m6A 甲基化與 RNA 剪接、外顯子結構和 RNA 結合蛋白包裹有尚未被認識的調弄機制。

2. RNA-mediated genome architecture revealed by high resolution mapping of chromatin contacts

「高解析度染色體接觸圖解析的 RNA 和基因體結構」

發表實驗室：Richard A. Young

RNA 能夠結合和調控轉錄因子及其他轉錄機制的成員。長非編碼 RNA (lncRNAs) 的轉錄能夠促成形成結構，藉此推測其他 RNA 物種可能參與基因調控機制和基因體分區。他們的研究結果顯示 RNA 能透過與特定的轉錄複合體互動而對染色體結構的產生影響。

3. The 100-nt Code Governing mRNA Methylation and mRNA Stability

「控制 m6A 甲基化和基因表達的 100 個核苷酸」

發表實驗室：Schrage Schwastz

m6A 是 mRNA 上一種廣泛不穩定標誌，修飾的分佈在轉錄體中並不一致，這樣具有選擇性的修飾機制還不清楚。他們的證據指出 m6A 修飾不是被選擇而是透過被排除：m6A 辨識保守序列中都會被設定要產生甲基化修飾，唯有當這樣的序列位於與 RNA 剪接點距離 100 個核酸之內不會發生甲基化修飾。他們建立一個非常簡單的 m6Apred-2 模型，完全基於已知的 m6A 修飾位點與外顯子-內顯子的結構，就能夠運算並重現過去實驗測得的 m6A 甲基體。證據也表明甲基化被排除在 RNA 剪接點附近是通過外顯子交界複合物引導的，可能是通過物理機制產生阻擋。另外也證明，過去觀察到的外顯子-內顯子結構和 mRNA 降解之間的關係，可能是通過 m6A 這個機制。職期望能利用 m6Apred-2 來偵測視網膜發育過程中能夠被 m6A 甲基化的轉錄體。

4. Detecting m6A at single-molecular resolution via direct-RNA sequencing and realistic training data

「透過直接 RNA 定序和真實訓練數據檢測單分子分辨率的 m6A」

發表實驗室：Christoph Dieterich

雖然在原理上，奈米孔定序中的直接 RNA 定序能夠探究每個 RNA 分子上每個單一鹼基和其特別化學修飾的可能性，但是到目前為止，計算分析方法的發展受到阻礙，因為缺乏具有在化學修飾上有單分子分辨率的生物真實訓練數據。以 m6A 為例，迄今為止的方法發展基於具有全有或全無化學修飾的合成 RNA 分子，或者其化學修飾分析未能達到單位點分析的 mRNA 資料庫。此實驗室報告了一種新的分析方式，他們通過精確控制合成各種具有不同位點和裝飾程度的 RNA 短分子，包括六種最常見的 DRACH 序列，再利用奈米孔 RNA 直接定序來分析。他

們還開發新的一種計算需求極小的轉移學習方法，稱為 mAFiA，利用基本神經網絡在鹼基呼叫期間生成的內部特徵來偵測 A 鹼基上具有 m6A 修飾的機率。另一個優點是，mAFiA 可以整合到現有的鹼基呼叫程式並且不影響其準確性。職希望未來能利用奈米孔定序及 mAFiA 法來解開視網膜類器官內的 m6A 變化。

5. m6A methylation pattern in the mammalian cortex using single-cell m6A profiling

「單細胞 m6A 剖析法分析哺乳動物大腦皮質的 m6A 甲基體」

發表實驗室：Kate D. Meyer

目前的實驗技術仍未能在單細胞層次上對活體複雜組織進行全局 m6A 的轉錄體分析，特別是在穩定的生理狀態下或反應環境變化時，甲基化轉錄體模式在每種細胞類型之間的差異程度仍然未知而且沒有工具探討。此實驗室過去建立了 DART-seq 來了解 m6A 修飾程度，這次他們發表了一個新的基因改造小鼠來實現偵測活體內每個單個細胞內的 m6A 轉錄體。為了印證此實驗方法，而且已知大腦組織具有高度豐富 m6A 修飾，所以他們選擇對成年小鼠大腦皮質組織進行了全轉錄體單細胞 m6A 定位。實驗結果顯示：甲基化轉錄體在大部分細胞類型之間是相當類似的，但某些 RNA 的甲基化在老化過程中在不同細胞類型之間產生差異，尤其是參與神經信號傳遞的重要基因。另外，微膠細胞中的 m6A 隨著老化大幅度減少，是一個從未被發現的現象。職在海報展示期間特別前往交流，作者表示在期刊發表之後，實驗室應該很願意分享此小鼠，希望學術圈一起來探究 m6A 的功能，又加上職過去十多年在基因改造小鼠的經驗非常期待未來能使用此小鼠與實驗方法探討視網膜神經細胞的 m6A 之生物功能。

6. Quantitative Mapping of mRNA Modifications in the Transcriptome

「在轉錄體中的 mRNA 修飾的定量次世代定序分析」

發表實驗室：Chengqi Yi

過去發展非常多種工具來偵測 RNA 上的 m6A，但一直缺乏能以全轉錄體層次進行絕對定量每個鹼基上 m6A 修飾程度的方法。最近他們基於乙醛和亞硝酸鹽為化學反應媒介來對未甲基化腺苷進行去胺基化，發展了一種 m6A 絕對定量方法，稱為 GLORI。此實驗設計之概念類似利用亞硫酸鹽對 DNA 5-甲基胞嘧啶定量的定序方法。GLORI 被證明能用來量化小鼠和人類細胞的 m6A 轉錄體，並證實是以單個鹼基為單位顯示 m6A 修飾程度。他們也發現，過去利用 m6A 抗體的定序結果定義以一個單峰聚集 m6A 修飾為一個 m6A 修飾，GLORI 則能在同樣單峰的範圍區間內偵測到多個 m6A 修飾位點，他們認為 GLORI 會是一種更方便的絕對定量 m6A 轉譯體的方法。職在回國之後更深入看完其發表的文章，將會試著建立這套系統來定性與定量視網膜神經節細胞的 m6A 甲基體，目前尚未有發表之文獻能呈現此數據。

m6A 相關重點海報：(未在演講中發表的)

1. m6A-mediated mRNA transport regulates axonogenesis in the developing brain

「m6A 調控的 mRNA 運輸控制發育大腦的軸突生成」

發表人：Hwang, Huiseon

為了探討 mRNA 化學修飾對是否對大腦發育和功能中產生影響，又由於 Mettl3/Mettl14 甲基轉移酶複合物的重要調控者，這個實驗室建立了神經細胞專一性 Mettl14 基因剔除小鼠。他們的實驗結果顯示神經細胞專一性 Mettl14 基因剔除小鼠的大腦中的 m6A 含量減少，並且在大腦皮質新生成過程中看到軸突的發育受到損害。RNA-seq 分析和單分子原位雜交實驗顯示，基因剔除小鼠的神經細胞中，特定 mRNA 在神經突觸的位置錯誤。他們使用 m6A-SAC-seq 分析單核苷酸解析度的 m6A 轉譯體，在神經細胞專一性 Mettl14 基因剔除小鼠的新生大腦內，被 m6A 修飾的 mRNA 參與在突觸組成、mRNA 加工和軸突生成等生物功能。他們還確認 YTHDF2 m6A 讀取蛋白在發育中腦部的體內半球髓束軸突中負責 mRNA 運輸，並還能藉由和動力蛋白、轉譯因子和微管進行蛋白交互作用以促進有效率地運輸 m6A 標記的 mRNA 到神經的遠端。本實驗證實在哺乳動物皮質神經發育過程中，後轉錄的機制調控軸突投射和生長。本海報展示了受到 m6A 調控的基因，包含 GAP43 和 MAP2，並且這些 mRNA 都能在軸突中被運輸。其實驗結果和職目前利用單細胞 RNA 分析人類視網膜類器官所得到的結果非常接近，並且這些 mRNA 的表現量隨著 mRNA 寫入和消除酵素被抑制而改變。

職的研究報告（摘要與海報）

題目：RNA modification plays a key role in retinal development

「RNA 修飾在視網膜發育中扮演關鍵角色」

摘要

RNA 化學修飾成為基因表達調控的新層面，被稱為表觀轉錄體。m6A 是 RNA 分子上最常見的化學修飾類型，並在 mRNA 中經常能被觀察到。m6A 甲基化由 METTL3 在“寫入者”複合物中進行，而在 m6A 的去甲基化由 FTO 和 ALKBH5 催化（即“橡皮擦”）。m6A“讀者”蛋白，如 YTHDF1 和 YTHDF2，則決定 RNA 的命運，使其被降解或增強轉譯。儘管已知 ALKBH5 專一地作用於 mRNA 並位於細胞核，而仍未清楚 FTO 的受質可能是 mRNA 或者還有其他 RNA 物種或者是兩者兼有。儘管在小鼠的視網膜特異性剔除 Mettl3、Mettl14 和 Ythdf2 基因的研究中顯示出表現型的異常，但其調控機制仍大部分未知。為了進一步研究 m6A RNA 修飾對視網膜發育的影響，我們利用人類誘導多能幹細胞（iPSC）分化出的視網膜類器官和小鼠胚胎觀察關鍵 m6A 調節因子的表達。初步結果顯示，在第一波視網膜發育的過程中，不論人類視網膜類器官還是小鼠胚胎，FTO 在以分化的視網膜神經節細胞中有專一性且高度的表達。因此我們在視網膜類器官 RGC 分化的發育階段，透過藥物來抑制 FTO 和 METTL3 的酵素活性，然後進

行了單細胞 RNA 定序來探索類器官中每種視網膜神經細胞類型的轉錄體。在視網膜神經節細胞集群，富集分析突顯了 FTO 和 METTL3 失去活性後，差異性表達基因多數參與在軸突引導和神經發育過程中，他們所轉譯的蛋白多數定位在突觸。在此階段的其他細胞，包括感光細胞、水平細胞（horizontal cell）和無軸突細胞（amacrine cell）中也觀察到類似的現象。這個結果與過去文獻相符，即約 85% 的突觸蛋白在 mRNA 層次有 m6A 修飾。其次，我們發現抑制 METTL3 活性還會影響轉譯和 RNA 分解的基因表達。最後，FTO 和 METTL3 抑制劑處理後的視網膜神經細胞發現的特異性表達基因有相當大程度的不重疊，暗示 FTO 和 METTL3 有不同的靶標 mRNA。綜述來說，我們目前的實驗結果表示 FTO 和 METTL3 調控視網膜神經節細胞發育中的軸突生長。

RNA modification plays a key role in retinal development

Yuan-chi Andrea Teng¹, Lin-Hsuan Su², Shih-Hwa Chiou^{1,2}

¹Department of Medical Research, Taipei Veterans General Hospital, Taiwan

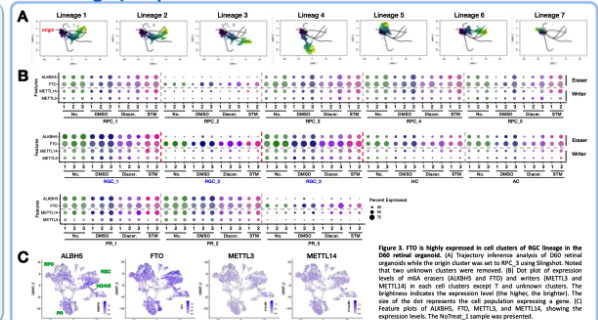
²Institute of Pharmacology, College of Medicine, National Yang Ming Chiao Tung University, Ta

鄧元淇助理研
究員的海報

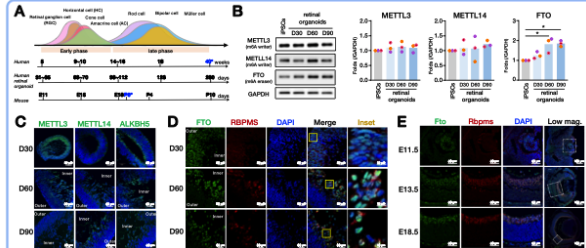
Abstract

Chemical modification on RNA demonstrates a new layer of regulation of gene expression, referred to as the epitranscriptome. N6-methylation on adenosine (m6A) is the most common type of chemical modification on RNA molecules and can be frequently observed in mRNA. The m6A methylation is carried out by METTL3 in the "writer" complex, and the removal of methylation on m6A is catalyzed by FTO and ALKBH5 (namely, the "eraser"). The m6A "reader" proteins, such as YTHDF1 and YTHDF2, determine the fate of the RNA transcript, being degraded or enhanced for translation. While ALKBH5 is known to specifically function on mRNA and localize in the nucleus, the substrate of FTO, whether it is mRNA or other RNA species or both, remains undefined. Although the retina-specific knockout of METTL3, METTL14, and Yth2 in mice demonstrated some abnormality, the underlying regulation is still largely unknown. To further characterize the impact of RNA modification on retinal development, we observed the expression profiling of key m6A modulators throughout retinal development in human inducible pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal organoids and mouse embryos. Our preliminary data demonstrate that the elevated expression of FTO in the retinal ganglion cells (RGCs) at the first wave of retinogenesis is conserved in humans and mice. We then pharmacologically inhibited the activity of FTO and METTL3 during the developmental stage of RGC differentiation and carried out the single-cell RNA-sequencing to explore the transcriptome of each cell type in the retinal organoids. Firstly, the enrichment analyses highlighted that the differentially expressed genes (DEGs) in FTO- and METTL3-inhibited RGCs are significantly involved in axon guidance and neurogenesis, and their coding proteins are located in synapses. A similar phenomenon was also observed in developing retinal neurons, including photoreceptors, horizontal cells, and amacrine cells. This is in line with the previous finding that approximately 85% of synaptic proteins were encoded by m6A-decorated transcripts. Secondly, we found that inhibiting METTL3 affects the transcripts regulating not only neurogenesis but also translation and RNA catabolism. Lastly, the DEGs found in FTO- and METTL3-inhibited retinal neurons were largely non-overlapped, implying that FTO and METTL3 have different target transcripts. In summary, our current data suggest that FTO and METTL3 regulate axon growth in RGC development.

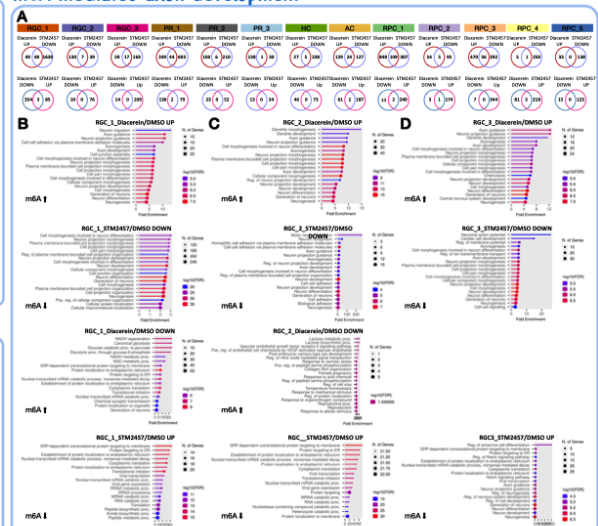
FTO is highly expressed in RGCs



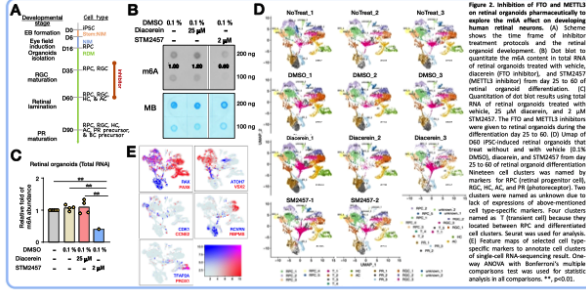
m6A writer and eraser in retinal development



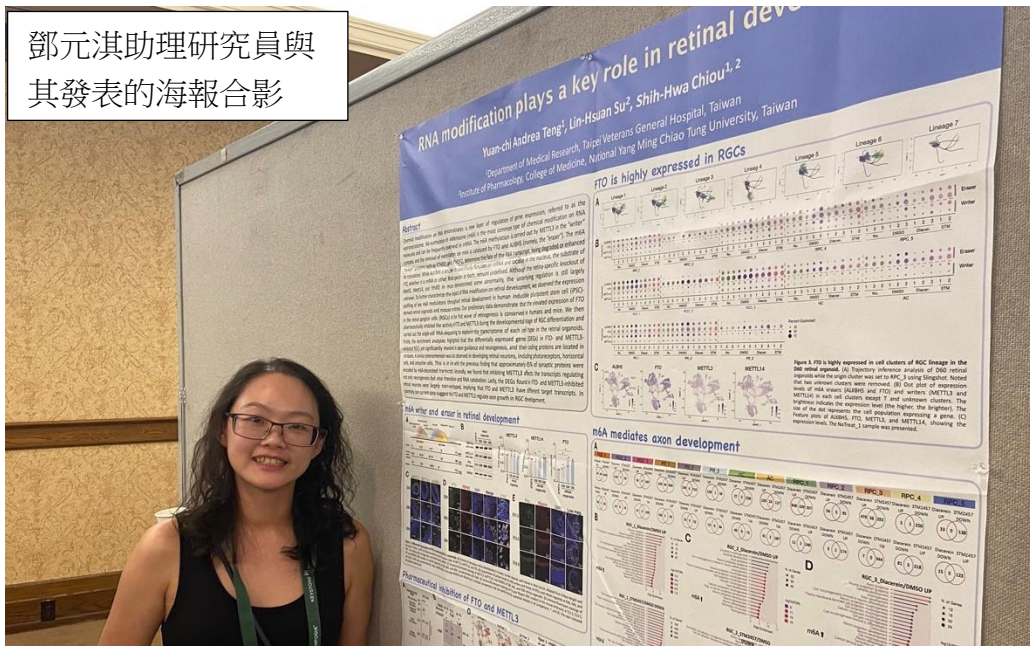
m6A mediates axon development



Pharmacological inhibition of FTO and METTL3



鄧元淇助理研究員與其發表的海報合影



可能的合作對象

1. Isabel S. Naarmann-de Vries, Adrian Chan, and Christoph Dieterich (Klaus Tschira Institute for Integrative Computational Cardiology, University of Heidelberg, Germany)

For m6A detection using nanopore direct RNA-sequencing (利用 Nanopore 定序和 mAFiA 演算法偵測 m6A transcriptome)

2. Martin A. Smith (Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Canada)

For m6A detection using nanopore direct RNA-sequencing (利用 Nanopore 定序和 m6Anet 演算法偵測 m6A transcriptome)

3. Matthew Tegowski and Kate D. Meyer (Duke University)

For genetically modified mouse to decipher the m6A-tagged transcriptome at single cell resolution (利用 DART 定序法進行單細胞 m6A transcriptome 分析)

心得與建議

職於民國 112 年 12 月 11-15 日參加在加拿大班夫舉辦的基石研討會 (Keystone symposia)，主題為「RNA 修飾與健康和疾病 (RNA modifications in health and diseases)」國際會議。由於職目前的研究需建立偵測單位點定量的 m6A RNA 修飾，因次此行最專注的議題為「RNA 修飾之分子機轉」和「研究 RNA 修飾之新實驗技術」兩項主題。本次在演講中獲得近兩年發表或者投稿中的研究，尤其關注 GLORI 對於職的將來的實驗計畫應用。另外也特別關注奈米孔定序的發展，包含新出的 RNA 直接定序試劑的效果，還有分析 m6A 的演算法，其中已經發表一陣子的 m6Anet 演算程式和新發表的 mAFiA 演算程式，都期待納入職未來的研究課題與工具。本次大會演講和海報都特別關注第三代定序奈米孔定序的使用與發展，建議本院能投入更多奈米

孔定序的新知與應用，培養分析其定序結果的生物資訊工程師。