

平成23年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 新学術領域研究 4. 研究期間 平成23年度～平成24年度

5. 課題番号

2	3	1	2	3	5	1	4
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 発生段階依存的な神経系細胞産生におけるDNMT1の機能解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
60379534	ナミヒラ 波平	マサカズ 昌一	バイオサイエンス研究科 助教

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本年度までは、胎生後期神経幹細胞の分化制御におけるDNMT1の役割を明らかにするため、in vitroにおいてウイルスを用いて胎生後期神経幹細胞にDNMT1の過剰発現及びノックダウンを誘導し、それによる分化傾向の変化を免疫染色法により観察した。結果、胎生後期神経幹細胞への野生型DNMT1の過剰発現はニューロン分化を抑制し、未分化状態にある神経幹細胞を増加させた。また、この作用はDNMT1のメチル化活性部位に変異を導入した変異型DNMT1の過剰発現においても同様に観察されたことから、その作用機構はDNMT1のDNAメチル化活性非依存的である可能性が得られた。一方、特異的shRNAによりDNMT1の発現減少を誘導した場合にはニューロン分化の亢進が観察され、且つ、この作用は神経幹細胞の未分化性が維持される培養条件においても観察された。これらの結果から、胎生後期神経幹細胞においてDNMT1はニューロン分化抑制作用を有することが示唆された。

さらに、電気穿孔法及び、タモキシフェンの投与によりDNMT1の欠損を神経幹細胞特異的に誘導できるNestinCreERT2/Dnmt1flox/floxマウスを用いて、in vivoでの解析を行った。その結果、DNMT1を過剰発現させた場合、成熟したニューロンが存在する皮質板へと遊走した細胞の減少が観察され、DNMT1を過剰発現している細胞は神経幹細胞が存在する脳室帯、脳室下帯に留まる割合の増加が見られた。さらに、NestinCreERT2/Dnmt1flox/floxマウスを用いて胎生後期でDNMT1をノックアウトした場合、皮質板に存在するニューロンへの分化傾向の増加が観察された。

以上の結果から、DNMT1はニューロン分化抑制作用を有していることが示唆された。

10. キーワード

- | | | | |
|---------------|----------|-----------|-----------|
| (1) DNAメチル化 | (2) 細胞分化 | (3) 大脳新皮質 | (4) 神経幹細胞 |
| (5) エピジェネティクス | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。
(理由) 上述したように、培養系を用いた in vitro による解析と、電気穿孔法と NestinCreERT2/Dnmt1flox/flox マウスを用いた in vivo 解析により、胎生後期の DNMT1 がニューロン分化に関与するという確実な結果を得ている。よって、来年度計画していた DNMT1 の標的ゲノム領域の同定や、相互作用因子の探索が速やかに行うことができるため、研究は概ね順調に進展しているといえる。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

来年度は、DNMT1 により遺伝子発現が制御されている標的遺伝子を明らかにするために、DNMT1 を過剰発現及び欠損させた神経幹細胞から mRNA を採取し、マイクロアレイ解析により、発現量が著しく変化する遺伝子を特定する予定である。これに加えて、これらの遺伝子プロモーター領域への DNMT1 の結合をクロマチン免疫沈降法により検出し、DNMT1 の標的遺伝子の同定を行いたいと考えている。加えて、標的遺伝子の同定後、DNMT1 の過剰発現及び欠損による標的遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の変化をクロマチン免疫沈降法により検出し、それにより予想されるヒストン修飾に関わる因子と DNMT1 の相互作用を免疫沈降法により明らかにしたいと考えている。

13. 研究発表（平成23年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (1) 件 うち査読付論文 計 (1) 件

著者名		論文標題						
Fujimoto Y, Abematsu M, Falk ., Tsujimura K., Sanosaka t., J uliandi B., Semi K., Namihira M., Komiya S., Smith A. & Nak ashima K.		Treatment of aouse model of spinal cord injury by transplantaion of h uman iPS cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells.						
雑誌名		査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁	
Stem Cells		有	in press	2	0	1	2	in press
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)								
10.1002/stem.1083								

著者名		論文標題					
雑誌名		査読の有無	巻	発行年			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)							

著者名		論文標題					
雑誌名		査読の有無	巻	発行年			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)							

〔学会発表〕計（ 9 ）件 うち招待講演 計（ 1 ）件

発表者名	発表標 題	
蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一	転写因子NFIAによって誘導されるOlig1遺伝子プロモーターの脱メチル化	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第5回日本エピジェネティクス研究会年会	2011年5月19日	KKRホテル熊本

発表者名	発表標 題	
波平昌一、Fan Guoping、中島欽一	DNAメチル化による神経発生制御機構	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第5回日本エピジェネティクス研究会年会	2011年5月19日	KKRホテル熊本

発表者名	発表標 題	
蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一	転写因子が誘導するOlig1遺伝子プロモーターの脱メチル化	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第34回日本神経科学大会	2011年9月14日	パシフィコ横浜

発表者名	発表標 題	
Namihira M	Roles of DNA Methylation and Methyltransferases in Neural Development	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第34回日本神経科学大会	2011年9月14日	パシフィコ横浜

発表者名	発表標 題	
田中友規、波平昌一、野口浩史、五十嵐勝秀、辻村啓太、中島欽一	Functional analysis of DNA-methyltransferase 1 in post-mitotic neurons	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月13日	パシフィコ横浜

発表者名	発表標 題	
野口浩史、波平昌一、田中友規、佐野坂司、中島欽一	DNMT1 inhibits the neuronal differentiation of late-gestational neural precursor cells	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月13日	パシフィコ横浜

発表者名	発表標 題	
蟬克憲、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一	NFIA-induced DNA demethylation in <i>Olig1</i> promoter regulates the expression of the gene in late-gestational neural precursor cells	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月13日	パシフィコ横浜

発表者名	発表標 題	
Noguchi, H., Namihira, M., Tanaka, T., Sanosaka, T., Nakashima, K.	DNMT1 regulates neuronal differentiation of neural precursor cell in late-gestational forebrain.	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
40 th KEYSTONE SYMPOSIA	January 17, 2012	Keystone, Colorado, USA

発表者名	発表標題	
波平昌一、野口浩史、田中友規、佐野坂司、中島欽一	DNMT1 regulates neuronal differentiation of neural precursor cell in late-gestational forebrain	
学会等名	発表年月日	発表場所
1 st International Symposium/59 th NIBB Conference NEOCORTICAL ORGANIZATION	2012年3月10日	岡崎コンファレンスセンター

【図書】 計 (1) 件

著者名	出版社				
Namihira M, Nakashima K.	東京スプリングー				
書名	発行年		総ページ数		
Neurogenesis in the adult brain I (eds. Seki, T., Sawamoto, K., Parent, J.M. & Alvarez-Buylla, A.)	2	0	1	1	21

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

【取得】 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--