

様 式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成23年度）

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

挑戦的萌芽研究

4. 補助事業期間

平成23年度～平成24年度

5. 課題番号

2

3

6

5

0

2

1

5

6. 研究課題

ゲノムDNA化学修飾のニューロン発達における機能解明

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 マサカズ	バイオサイエンス研究科	助教
	波平 昌一		

8. 研究分担者

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

精神疾患発症やストレス応答脆弱性に、神経細胞（ニューロン）におけるゲノムDNAメチル化の関与が指摘され、さらにニューロンにおいて新たにヒドロキシメチル化というゲノム修飾が発見されるなど、脳・神経系におけるDNA化学修飾機構についての研究は、近年世界的に注目を集めている。そこで、本研究では、ニューロンの発達におけるDNA化学修飾の意義と、その酵素群の機能解析を行うことを目的とする。

本年度はまず、ニューロン発達におけるDNA化学修飾酵素の役割を解析した。shRNAの発現によるDNAメチル化酵素Dnmt1のノックダウン（KD）を誘導し、ニューロンの形態的变化の有無を観察した。その結果、DNMT1KDニューロンでは、コントロールと比較すると、軸索がより伸長する傾向にあることがわかった。一方で、DNMT1の過剰発現したニューロンにおいては、軸索伸長が抑えられる傾向にあった。また、メチル化活性を持たない変異型DNMT1を過剰発現させたニューロンにおいても、同様の軸索伸長の抑制効果が観られた。これらにより、DNMT1はメチル化活性非依存的に、ニューロン軸索伸長を制御する機能を持つ可能性が示唆された。次に、DNMT1KDニューロンから培養上清を回収し、野生型ニューロンに添加する実験をおこなった。その結果、DNMT1欠損ニューロン由来の培養上清を用いた培養においては、軸索伸長がより促進されたことから、DNMT1KDによる軸索伸長の促進は、培養液中に産生する細胞外因子によるものであることを示唆した。また、ニューロンの軸索伸長に関わるTrk受容体のTrkBとTrkCの活性化がDNMT1KDニューロンにおいて観察された。これらの結果は、DNMT1がそれらの受容体の活性化調節を介して軸索伸長を制御することを示唆している。現在、DNMT1の標的領域等の同定と、相互作用因子の探索を行っている。

10. キーワード

(1) ニューロン	(2) 発達	(3) DNAメチル化	(4) エピジェネティクス
(5) DNAヒドロキシメチル化	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(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、本年度は、DNAメチル化酵素の一つDNMT1がTrkレセプターの活性化を介してニューロンの軸索伸長を制御していることを突き止めた。このことは、DNA化学修飾酵素がニューロンの発達に寄与していることを示しており、本研究の目的の一つである、ニューロン発達におけるDNA化学修飾酵素の機能解析を明らかにする上で基盤となる成果である。また、発達中のニューロンのTrkレセプター活性化経路がDNMT1によって制御されているという結果は、次年度に予定されているDNA化学修飾酵素の標的領域決定や相互作用因子の探索を実行する上でも重要な成果である。従って、本研究課題は概ね順調に進展していると考えられる。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後も、当初の研究計画通り進める予定である。具体的には以下の通りである。

1) DNMT1 KDニューロンからRNAを回収し、マイクロアレイによって発現遺伝子を同定する。同時にDNAも回収し、MeDIP法を行い、発現が変化した遺伝子の転写調節領域のメチル化状態を調べる。さらに、DNMT1抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ハイスループットシーケンサーを使用しニューロンにおけるDNMT1標的領域の同定を行う。さらに、DNMT1の相互作用因子をタンパク質質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて解析する。これらにより、ニューロン発達におけるDNMT1の機能を明らかにする。

2) ニューロンにおいて特異的にDNMT1が欠損したSynapsinCre-Dnmt1floxマウスを用いて、恐怖条件付け試験により記憶能力の発達におけるDNMT1の役割を調べる。さらにオープンフィールド試験、明暗往来試験等を行うことで、情動行動に関わる脳領域の発達における役割も解析する。これらの実験によりマウスの行動に変化が見られた場合、海馬領域などを短期スライス培養し、電気生理学的手法により長期増強(LTP)や長期抑制(LTD)の変化を調べる。

(次年度の研究費の使用計画)

次年度も概ね研究費は、培養器具やプラスチック器具などの消耗品費、実験試薬やキット購入費、マウス購入費、遺伝子改変マウスの維持費として使用予定である。また、ハイスループットシーケンサー使用のための試薬費としても使用する。さらに、日本分子生物学会に参加するための交通費などの旅費として使用する予定である。

13.研究発表(平成23年度の研究成果)

[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 A., Tsujimura K., Sanosaka T., Juliandi B., Semi K., Namihira M., Komiya S., Smith A. & Nakashima K.		Treatment of aouse model of spinal cord injury by transplantation of human 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	-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1002/stem.1083						

[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		平成23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		平成23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		平成23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 (招待講演)	平成23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	平成23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	平成23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
40th 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	
1st International Symposium/59th NIBB Conference NEOCORTICAL ORGANIZATION	平成24年3月10日	岡崎コンファレンスセンター	

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 Olig1 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	平成23年12月13日	パシフィコ横浜	

〔図書〕計(1)件

著 者 名	出 版 社		
Namihira M, Nakashima K.	東京スプリング		
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.)		2011	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