

平成22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 挑戦的萌芽研究 4. 研究期間 平成21年度～平成22年度
5. 課題番号 2 1 6 5 7 0 5 0
6. 研究課題名 特定一塩基、一細胞レベルでのDNAメチル化可視化技術の開発とその細胞生物学的応用

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 5 3 1 1 1 5	たきざわ たくみ 滝沢 琢己	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。

申請者らがこれまでにDNAメチル化が分化に伴い減少することを明らかにしたアストロサイト特異的遺伝子glial fibrillary acidic protein (GFAP)のプロモーター上のSTAT3結合配列を標的とし、メチル化頻度が高いマウス胎生11.5日由来神経上皮細胞を用いて昨年に引き続き検討した。既に、定量的PCRにてメチル化に感受性があることを確認しているICONプローブ技術を用いて、標的配列に相補的なプローブを作成した。昨年度は、プローブの5'側をビオチン分子で標識し、定法に則って、プローブをハイブリダイゼーションさせた後、オスミウムの存在下で反応させプローブとメチル化標的配列との間にオスミウム塩による架橋を形成し、ほぼ不可逆的なハイブリッドを誘導した。この後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼを反応させ、プローブにペルオキシダーゼを結合させた後に、Tyramid-ビオチンを用い周囲のタンパク質をビオチンラベルしプローブ検出感度の増加を図った。更に、ストレプトアビジンペルオキシダーゼを反応させた後に、tyramidとAlexa555色素の化合物を反応させ、プローブの蛍光色素ラベルを試みた。しかし、プローブの検出はできなかった。このため、プローブの標識を増やすために、aminoallyl-dUTPを複数ふくむプローブを作成し、Biotin-conjugated succinyl esterにて複数のbiotinで標識、あるいは、Psoralen-biotin システム (Ambion) を用いて、非特異的にプローブを複数のbiotin分子標識を行い、上記手技を施行しシグナルの検出を図ったが、感度が低く検出に至らなかった。現在、検出方法を改良し、感度を上げる方法を検討中である。

10. キーワード

- (1) エピジェネティクス (2) DNAメチル化 (3) 細胞分化
- (4) 核構造 (5) (6)
- (7) (8) (裏面に続く)

11.研究発表（平成22年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 0 ）件 うち査読付論文 計（ 0 ）件

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
			！ ！ ！	

〔学会発表〕 計（ 13 ）件 うち招待講演 計（ 2 ）件

発表者名	発表標題		
滝沢琢己、高木美智、伊藤謙治、中島欽一	神経活動依存性転写の時空間的制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第9回 核ダイナミクス研究会	2010年5月28日	ラフォーレ修善寺	

発表者名	発表標題		
Misato Tkagi, Hirotooshi Sasaoka, Kenji Itoh, Hiroshi Kimura, Kinichi Nakashima, <u>Takumi Takizawa</u>	Spatiotemporal regulation of activity-dependent genes in post-mitotic neurons		
学会等名	発表年月日	発表場所	
The 75 th Cold Spring Harbor Symposium: Nuclear Organization & Function	2010年6月5日	Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA	

発表者名	発表標題		
裏山悟司、 <u>滝沢琢己</u> 、堀由貴奈、神山淳、中島欽一	胚性幹細胞におけるGFAP遺伝子の発現制御機構の解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会 第10回春季シンポジウム	2010年6月8日	ホテル松島大観荘	

発表者名	発表標題		
佐野坂司、波平昌一、 <u>滝沢琢己</u> 、中島欽一	アストロサイト分化誘導性サイトカイン発現細胞の同定		
学会等名	発表年月日	発表場所	
Neuro 2010	2010年9月3日	神戸コンベンションセンター	

発表者名	発表標題		
<u>滝沢琢己</u> 、高木美智、笹岡寛敏、伊藤謙治、中島欽一	神経活動依存性遺伝子発現の時空間的制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
Neuro 2010	2010年9月3日	神戸コンベンションセンター	

発表者名	発表標題		
佐野坂司、波平昌一、 <u>滝沢琢己</u> 、中島欽一	Meningeal Cells Induce Astrocyte Differentiation of Neural Stem Cells.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
The 29 th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD	2010年10月6日	湘南国際村センター	

発表者名	発表標題		
Takumi Takizawa, Misato Takagi, Kenji Itoh, Kinichi Nakashima	Spatiotemporal regulation of activity dependent genes in post-mitotic neurons		
学会等名	発表年月日	発表場所	
40 th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010	2010年11月15日	San Diego, USA	

発表者名	発表標題		
Tsukasa Sanosaka, Masakazu Namihira, Takumi Takizawa, Kinichi Nakashima	Meningeal cells express astrocyte inducing cytokines in the developing mouse brain.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
40 th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010	2010年11月15日	San Diego, USA	

発表者名	発表標題		
Satoshi Urayama, Takumi Takizawa, Yukina Hori, Jun Kohyama, Kinichi Nakashima	Analysis of DNA methylation independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
40 th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010	2010年11月15日	San Diego, USA	

発表者名	発表標題		
滝沢琢己	神経系細胞における遺伝子座核内配置		
学会等名	発表年月日	発表場所	
BMB2010	2010年12月8日	神戸ポートアイランド	

発表者名	発表標題		
裏山悟司、滝沢琢己、神山淳、中島 欽一	Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells (ESCs)		
学会等名	発表年月日	発表場所	
BMB2010	2010年12月8日	神戸ポートアイランド	

発表者名	発表標題		
滝沢琢己	Identification and Spatio-temporal Regulation of Distinct Classes of Activity-dependent Genes in Post-mitotic Neurons		
学会等名	発表年月日	発表場所	
International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities	2011年1月25日	淡路夢舞台国際会議場	

発表者名	発表標題		
滝沢琢己	神経活動依存性遺伝子発現の時空間的制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本農芸化学会 2011年度大会	2011年3月28日	京都女子大学の予定が中止となり、講演予稿集の発行をもって成立	

〔図書〕 計 (0) 件

著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数

12. 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

13. 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。

--