

平成 2 6 年度科学研究費助成事業（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 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成 2 5 年度～平成 2 7 年度
5. 課題番号

2	5	・	9	5	6	1
---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 ヘミメチル化認識因子 NP95 による成体海馬ニューロン新生制御メカニズムの解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
	ムラオ ナオヤ	バイオサイエンス研究科	特別研究員(DC1)
	村尾 直哉		

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

本年度においてはNP95の欠損によるニューロン新生の解析として、成体神経幹・前駆細胞の分化に対する影響の解析を行った。昨年度までの解析より、NP95の欠損により成体神経幹・前駆細胞のニューロン分化が抑制されることを明らかにしている。そのため、NP95を欠損した成体神経幹・前駆細胞がType1神経幹細胞のまま留まっている割合、及びアストロサイトへと分化した割合を調べた結果、NP95の欠損によりType1神経幹細胞及びアストロサイトの割合の上昇が観察された。この実験により、ニューロンへと分化できなかった神経幹・前駆細胞は未分化のType1神経幹細胞のまま維持される、若しくはアストロサイトへと分化することが示唆され、NP95欠損による神経幹・前駆細胞のより詳細な動態変化が明らかになった。このことは神経幹・前駆細胞におけるNP95の役割を解明するうえで非常に意義深いものであったと考えられる。

また成体海馬歯状回に加え、成体神経幹細胞が局在するもうひとつの領域である側脳室前方上衣下層においてNP95のニューロン新生への関与を調べた。その結果、側脳室前方上衣下層においてもNP95の欠損により神経幹・前駆細胞の増殖やニューロン新生が抑制されることが明らかになった。このことより、NP95は成体海馬歯状回、側脳室前方上衣下層どちらの神経幹・前駆細胞においても重要な役割を果たすことが示された。

さらに、NP95の機能解析を側脳室前方上衣下層と海馬の歯状回部位の組織から2種類の成体神経幹細胞を単離、培養した。この細胞を分化誘導したところ、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化が確認されたことから、成体の均一な神経幹細胞（NS細胞）が得られたと判断した。この細胞の利用することでin vitroにおいてもNP95のターゲットの探索などの機能解析が可能となった。

10. キーワード

- | | | | |
|---------------|---------------|----------|-----------|
| (1) 成体ニューロン新生 | (2) エピジェネティクス | (3) NP95 | (4) 神経幹細胞 |
| (5) | (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)

今年度は、得られたデータをもとにひとつ目の論文を投稿し受理された。また、NP95の機能解析も順調に進行しており、NP95が成体神経幹・前駆細胞の増殖・分化のみならず、新生ニューロンの成熟にも寄与していることを明らかにした。また、それらのメカニズムの解明にも着手しており、いくつかの遺伝子の発現変化がNP95の欠損によって引き起こされる成体ニューロン新生抑制メカニズムの一端を担っている可能性を示した。このような理由から当研究はおおむ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

(今後の推進方策)

今後は以下に挙げる2つの項目に着目し、研究を遂行していく予定である。

- 成体神経幹細胞におけるNP95の標的因子と標的ゲノムDNA領域の同定
Np95cK0マウスの成体神経幹細胞から採取しNP95が欠損した成体神経幹細胞において遺伝子発現がどのように変化したのかを次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法により解析する。また、同時に遺伝子の転写調節領域のメチル化状態の変化を Post-bisulfite Adapt or Tagging (PBAT) 法により解析する。これらの網羅的な解析によってNP95を欠損した成体神経幹細胞で遺伝子の発現レベルが上昇し、且つその転写調節領域のメチル化が減少したものが見つければ、その遺伝子はNP95の欠損によりメチル化状態の維持が破綻した結果、遺伝子の発現レベルが上昇した可能性が考えられる。さらに、その領域へのNP95結合をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により調べる。これらにより、成体神経幹細胞においてNP95によって制御される遺伝子とゲノム領域の同定を行う。また、培養成体神経幹細胞でその因子をノックダウンし、成体神経幹細胞の増殖や分化に対する影響を調べることで、その因子の成体ニューロン新生における重要性を確認する。
- 成体ニューロン新生が関与する海馬依存的な学習・記憶形成におけるNP95の役割の解明
海馬における成体ニューロン新生は海馬依存的な学習・記憶形成に必須である。そこでNP95のcK0マウスとそのコントロールマウスに対して恐怖条件付け試験を行うことで、NP95の欠損が学習・記憶形成に与える影響について解析する。

13.研究発表(平成26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			
Naoya Mura, Taito Matsuda, Hirofumi Noguchi, Haruhiko Koseki, Masakazu Namihira & Kinichi Nakashima		Characterization of Np95 expression in mouse brain from embryo to adult: A novel marker for proliferating neural stem/precursor cells			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Neurogenesis	有	1	2014	1-11	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.4161/23262133.2014.976026					

(学会発表) 計(3)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
Naoya Mura, Taito Matsuda, Haruhiko Koseki, Masakazu Namihira, Kinichi Nakashima		Analysis of mechanisms underlying neurogenesis in the adult hippocampus regulated by hemimethylated DNA recognition factor, Np95/Uhrf1.	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第12回幹細胞シンポジウム	2014年05月30日～2014年05月31日	九州大学医学部百年講堂、福岡県、福岡市	

発表者名		発表標題	
村尾 直哉、松田 泰斗、野口 浩史、古関 明彦、波平 昌一、中島 欽一		ヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1による成体海馬ニューロン新生制御メカニズムの解明	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市	

発表者名		発表標題	
村尾 直哉、松田 泰斗、野口 浩史、古関 明彦、波平 昌一、中島 欽一		ヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1による成体海馬ニューロン新生制御メカニズムの解明	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第8回神経発生討論会	2015年03月19日～2015年03月20日	九州大学医学部病院キャンパス コラボステーション1、福岡県、福岡市	

(図書) 計(0)件

著者名		出版社		
書名		発行年	総ページ数	

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