

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790288

研究課題名(和文)概日リズムの中核である視交叉上核の位置決定と機能獲得のしくみ

研究課題名(英文)The mechanism of development of the suprachiasmatic nucleus

研究代表者

畠山 淳(Hatakeyama, Jun)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：90404350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアから植物、動物、地球上のほぼ全ての生物は、約24時間周期の体内時計を持っている。ほ乳類では、この概日リズムを作り出す生物時計の中核は視交叉上核で、その機能はよくわかっている。しかしながら、視交叉上核の発生機構はほとんどわかっていない。本研究において、発生期の視交叉上核にホメオボックス型転写因子のLhx1、視交叉上核になる神経幹細胞にホメオボックス型転写因子Dbx1が発現していることを明らかにした。さらに、Dbx1ノックアウトマウスの解析より、Dbx1は視交叉上核のニューロンの形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Every kingdom of life-bacteria, plants, and animal- has 24-hours rhythms. In mammal, the suprachiasmatic nucleus (SCN) works as a center of the biological clock and the function is well known. However the mechanism of development of that is poorly understood. I found that homeobox genes, Lhx1 and Dbx1, are expressed by differentiating neurons and neural progenitors of SCN respectively. And Ror-alpha is also expressed by differentiating neurons of SCN. In Dbx1 knockout mice, neurons of SCN which are Ror-alpha positive cells were decreased. This result indicated that Dbx1 is important for the formation of SCN.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医科学一般

キーワード：視交叉上核 神経発生 核形成

1. 研究開始当初の背景

バクテリアから植物、動物、地球上のほぼ全ての生物は、約24時間周期の体内時計を持っている。睡眠や摂食行動、自発運動の活性化、ホルモン合成などの行動や生理機能はこの周期に依存しており、この周期を概日リズムと呼ぶ。ほ乳類では、概日リズムを作り出す生物時計の中核は視交叉上核で、視交叉上核を破壊すると副腎皮質ホルモンや行動の概日リズムが消失することがわかっている。概日リズムは、BMAL1やCLOCK、PERなどからなる転写因子(時計因子)のネガティブフィードバックによる転写活性の24時間周期が基盤になっている(図1)。また、視交叉上核は、視交叉の直上に位置し、視神経からの外部入力を受け外部環境との調和をとっている。このように、概日リズムの中核である核の存在とその機能の重要性、その分子メカニズムは多くのことが明らかにされている。しかしながら、視交叉上核の発生機構はほとんどわかっていない。また、視交叉上核の発生期の様相がその後の概日リズムにどのような影響を及ぼすのかわかっていない。

2. 研究の目的

地球上のほぼ全ての生物には、約24時間周期の体内時計が存在し、睡眠やホルモン合成などの生理機能のリズムに深く関わっている。ほ乳類の概日リズムの中核は、視交叉上核で、この核は視神経が交叉する直上の視床下部に位置する。概日リズムの分子メカニズムやその機能は明らかになりつつあるが、視交叉上核の発生機構はほとんど未解明である。また、脳の神経核構造の発生機構は不明な点が多い。本研究では、1)視交叉上核の空間配置決定機構と2)概日リズムの中核としての機能獲得の機構を明らかにすることを目的とする。この研究では、視交叉上核の発生機構の解明とともに、神経核の空間配置決定の概念を導き出すことに挑戦する。

3. 研究の方法

1)視交叉上核の空間配置決定機構の解明、

そして2)視交叉上核の概日リズムの機能獲得の機構を明らかにするために、以下の点に着目して研究をすすめる。

A) 視交叉上核を構成するニューロンはどの領域の神経幹細胞から産生されるのか? B) 視交叉上核を産み出す神経幹細胞の決定に関わる因子は何か? C) 産生されたニューロンが視交叉直上に神経核を形成する機構は何か? D) 視交叉上核で特異的に時計因子群が発現する機構は何か?

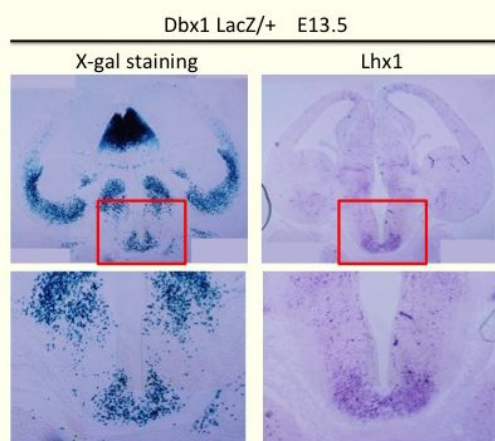
視交叉上核に発現している因子の変異マウスの解析や子宮内エレクトロポレーション法を主に用いて、上記の点について明らかにする。

4. 研究成果

1) 視交叉上核を構成するニューロンは、マウスにおいて胎生12日目から15日目に誕生することがすでに報告されている。しかし、その発生機構は全くわかっていない。我々は視交叉上核のニューロンが誕生する場所、もしくは視交叉上核のニューロンに発現している分子を探索した。そして、発生過程の視交叉上核に転写因子のDbx1, Lhx1, Rorが発現していることを見つけた。

我々は、視交叉上核の発生初期(マウス胎生13日目)にすでにホメオボックス型転写因子Lhx1が、視交叉上核特異的に発現していることを我々は明らかにした。さらに、Dbx1は、Lhx1よりも早い時期の胎生12日目に、視交叉上核のすぐ近くの神経幹細胞に発現があった。Dbx1が視交叉上核のニューロンを産み出す神経幹細胞に発現しているのかどうか、解析を行った。Dbx1^{lacZ/+}を用いて、Dbx1陽性の神経幹細胞の運命を追跡するためにX-gal染色し、視交叉上核に発現しているLhx1の発現と比較した。その結果、Dbx1陽性だった神経幹細胞は、Lhx1陽性の領域の視交叉上核の細胞に分化していることが明らかとなった。

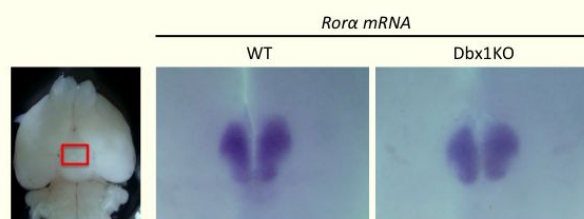
Dbx1はSCNニューロン前駆細胞に発現している



さらに、Dbx1^{lacZ/lacZ} ノックアウトマウスで視交叉上核ができるかどうか、解析を胎生 18 日目で行った。ノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、胎生 18 日目が一番発生ステージが進んだ試料となる。whole mount in situ hybridization 法もしくは section in situ hybridization 法、免疫染色法で解析を行った。Dbx1^{lacZ/lacZ} ノックアウトマウスでも Lhx1 や Bmal1, Ror でみる視交叉上核は形成されていた。しかし、Ror 陽性細胞の総数を解析したところ、ノックアウトマウスではその数が減っていることがわかった。このことから、Dbx1 は、視交叉上核を形成しているニューロンの分化に重要であることが明らかとなった。視交叉上核になる神経幹細胞の増殖に働いているのか、分化決定のところでは働いているのか、他の機能があるのかについては、今後明らかにしなければならない。

さらに、Dbx1 を強制発現すると、視交叉上核の発生に影響するかどうか検討をしている。子宮内エレクトロポレーション法により視交叉上核が発生してくる場所を含

Dbx1ノックアウトマウスではRora陽性細胞が減っている



めた領域に Dbx1 を強制発現させる。視交叉上核の周囲で Dbx1 が異所的に発現した細胞がどのような運命をたどったのか解析する。Dbx1 が発現することで視交叉上核のニューロンへと分化することを期待する。Dbx1 ノックアウトマウスの解析については、Pierani 博士（フランス）に分与いただいた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1)

Hatakeyama J. and Shimamura K.
Electroporation for the chick embryo CNS.
Electroporation Methods and Neuroscience
Springer 2014 in press
査読有り

2)

Zhang J, Hatakeyama J., Eto K. and Abe S-I.
Reconstruction of a seminiferous tubule-like structure in a 3 dimensional culture system of re-aggregated mouse neonatal testicular cells within a collagen matrix.
General and Comparative Endocrinology
2014 in press
査読有り

3)

*Hatakeyama J., Wakamatsu Y, Nagafuchi A, Kageyama R. and *Shimamura K.
Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates.
Development 2014 Apr 8
141: 1671-1682 *corresponding author
査読有り

* Development内の 4 月最も読まれたTop20
に選出 * Faculty of 1000に選出

4)

Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, Fraser ST,
Hatakeyama J., Bresnick EH, Kageyama R,
Dzierzak E,

Yamamoto M, Espinosa L, Bigas A.
Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling.

J Exp Med. 2013 Jan 14;210(1):71-84.

査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

1)

Kenji Shimamura, Jun Hatakeyama, and Haruka Sato-Takemoto

Pace control of neurogenesis regulated by transient retention of the apical endfoot of differentiating cells via Notch signaling.

Cortical Development Conference 2014
May 22-25, 2014 Chania, Crete, Greece

ポスター発表

2)

畠山 淳

「脳の形作り」の解明を目指して

動物・植物・生態学会三学会合同熊本例会

(招待講演)

2013年11月16日 熊本市

口頭発表

3)

Jun Hatakeyama, Andrew Lumsden, Ryoichiro Kageyama and Kenji Shimamura

A novel boundary in the developing central nervous system

Exciting Biologies October 17-19, 2013
Savudrija, Croatia

ポスター発表

4)

畠山 淳

「脳の形作り」の解明を目指して

熊本シンポジウム2014

2013年6月25-26日 熊本市

口頭発表

5)

Jun Hatakeyama, Yoshio Wakamatsu, Ryuichi Shigemoto, Akira Nagafuchi, Kenji Shimamura

The apical endfoot of nascent neuron controls the pace of neurogenesis through the regulation of notch signaling.

Neuro2013 第36回日本神経科学会

2013年6月20-23日 京都市

口頭発表

6)

Jun Hatakeyama, Yoshio Wakamatsu, Ryuichi Shigemoto, Akira Nagafuchi, Kenji Shimamura

The apical endfoot of nascent neuron controls the pace of neurogenesis through the regulation of Notch signaling.

“The Making of a Vertebrate” CDB symposium 2013 March 4-6, 2013 Kobe, Japan

ポスター発表

7)

Haruka Sato-Takemoto, Jun Hatakeyama, Nobuhiko Yamamoto, Kenji Shimamura

Afferent-dependent formation of the cytoarchitectonic features in mouse neocortical areas.

The 35th annual meeting of the Japan neuroscience society. September 18-21, 2012 Nagoya, Japan

ポスター発表

8)

Kunimasa Ohta, Yohei Shinmyo, Nahoko Kaneko, Yuki Hirata, Jun Hatakeyama, Masahiro Yamaguchi, Kenji Shimamura, Kazunobu Sawamoto, Hideaki Tanaka, Ayako Ito

Tsukushi maintains the growth and undifferentiated properties of neuronal stem/progenitor cells as a niche molecule

The 35th annual meeting of the Japan neuroscience society. September 18-21, 2012 Nagoya, Japan

ポスター発表

9)

Jun Hatakeyama, Yoshio Wakamatsu, Ryuichi Shigemoto, Kenji Shimamura

Regulation of Notch signaling through the adherens junction in neurogenesis and somitogenesis.

Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th (日本発生生物学会、日本細胞生物学会合同年会)

2012年5月28-30日 兵庫県神戸市

口頭発表 + ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

畠山 淳（HATAKEYAMA, Jun）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：90404350

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし