

## NSF 時間生物学センター2大教授の比較教授学

山崎 晋

バージニア大学生物学部

本稿はSCN特集号の中でかなり異色であることを承知して、あえてこのテーマを選んだのは、アメリカのサーカディアンリズム研究の中心的存在である時間生物学センターがどういった研究を行っているか(または行おうとしているか)を伝える事が、私がSCNの総説を書くよりも読者の方にSCN研究(サーカディアンリズム研究)の現状を知ってもらえるのではないかと思ったからである。しかし、いざ書き出してみると、話はわき道にそれがちで、本稿がSCNの総説としての役割をほとんど果たしていないことに気がついた。そこで本稿の最後に、SCN研究で私自身が興味を持っている問題を取り上げた。

現在、私は NSF 時間生物学センターで、Michael Menaker (Mike)、Gene D. Block (Gene) 両教授のもとで、自由行動下のハムスターの脳のいろいろな部位から電気活動のリズムを長期記録し、そこに含まれる複数周波数成分を解析するといった研究をしている。In vitroの系がSCN研究の主流となっている中で、あえてこの方法を選んだのは、SCN(サーカディアンペースメーカー)がどのようにして活動リズムをコントロールしているか、SCNがどのようにして光などの環境情報を受け取りそれらに同調しているか、を知るのには、インタクトの状態をモニターすることが一番近道であると思ったからである。さらには、この方法で、SCNに存在する複数ペースメーカー間の相互作用も知ることができると思っている。もともと、このテクニックは、三菱化成生命科学研究所で井上慎一先生(現:山口大学)がラットのSCNがサーカディアンオシレーターであることを示す実験で開発した(Inouye and Kawamura 1979, 1982)。その後、残念ながらだれもこの方法を受け継いでおらず、ごく最近、オランダのJ. Meijerのグループが試みただけである(Meijer et al., 1996, 1997)。私は、井上先

生のもとでポスドクとして1年間ほど過ごしたが、その当時はすでにこの研究は続けられておらず、SCNの細胞内伝達物質や神経伝達物質のサーカディアン変動を調べる実験を行っていた(Yamazaki et al., 1994a, b)。それでも、私は電気生理が好きであったため、日頃から井上先生から苦労話や細かなテクニックを聞いており、またすっかり実験室の片隅に追いやられてしまったかつて活躍していた電気生理の機械(パルスカウンタからはSCNからであろうきれいな周期的な電気活動を示した紙が半分出たままになっていた)を眺めては当時行われていたであろう実験光景をあれこれと勝手に想像していたものである。こちらへ来て、実験をセットアップする際にも井上先生から詳しい情報を教えて頂いたので、自分で一から始めるよりもずっと早くできた。それでも、アメリカにはこの実験に適した既製のアンブがなく自分で作らなければならなかったこと、ハムスターはラットとあらゆる面で少しずつ違い、ラットのテクニックをそのまま使えなかったこと、輪回し活動も同時記録したかったので、頭に置いたアンブにワイヤーがつながっているハムスターが回し車に自由に出入りできる工夫をしなければならなかったことなどから、安定した記録が取れ始めるのに2年間もかかってしまった。その間、井上先生から、「たとえ今、きれいなリズムが記録できなくとも続けていれば必ず取れるようになる」と、先生自らの経験に基づく励ましの言葉を頂いた。

こちらへ来た時、私の給料は、Russell G. Fosterのグラントから支払われていたが(山崎, 1995)、来て1年が過ぎた時点でRussellがイギリスに帰ることが決まり、グラントが継続できない(つまり私の給料が支払われない)という事態が生じた。給料の支払いがないと「1ピザでは違法滞在になってしまうので、

私は日本へ帰国するか他の給料を保証してくれる場所への移動を考えなければならなくなった。Mike はちょうどグラントの切れ目で、私の給料を保証できないから、積極的に他を探せということとなり、いろいろあたってみたところ、カナダの Ben Rusak とドイツの Ebo Gwinner から好意的な返事を頂き、積極的な話し合いを進めた。しかし、他へ移るとなるとこちらで手がけたことを結果も出さずに捨ててしまわなければならない。そんな時、Gene が私のテクニックと出始めていた結果に興味を示してくれた。また、それは新しく申請するグラントの内容に相当ではないかと言ひ、Mike と話し合っ2人でグラントの残りを出し合っ、とりあえずなんとか3カ月ずつ給料を延長して、その間にグラントを申請して、それが通ったら3年間の給料を保証するといった条件を提示してくれた。しかし、グラントが取れる保証はないし、3カ月ごとの延長は決して好条件とは言えないので、私が他へ移動するならそちらを選んでも構わないとの事だった。厳しい決断を余儀なくされたが、この研究を続けるためにこちらに留まることを選んだ。どうやら私は正しい選択をしたようで、グラントも無事にとれ、私の給料は40%アップしたうえに3年間保証された。そのおかげで、ハムスターの輪回し行動が SCN の電気活動に影響を及ぼすこと(Yamazaki et al., 1996a)、SCN の出力系の一部を明らかにできたこと(Yamazaki et al., 1997)、SCN のサーカディアンリズムはタウミューテーション(活動リズムが20時間になる突然変異)の影響を受けるが、SCN のウルトラディアンリズムは受けない(Yamazaki et al., 1996b)などの結果を示すことができた。しかし、私の立場は複雑になり、給料は Gene が出して、スペースは Mike が提供してと、両ラボに所属している形となった。また、大規模なプロジェクトの拡大となり、今まで自分のペースで実験していたことが、ポストドク、学生、テクニシャンの参加によって出来なくなり、彼らのペースにこちらが合わせなければならなくなった。いわゆる”中間管理職”となってしまった。実験が早く進む反面、人間関係のトラブルも増えた。両方のラボミーティングにも出席しなければならな

ったり、新しい実験を始めるときや、学会発表の内容なども、2人のポストと話し合わなければならなかったりと(しかも、両者ともにとても忙しく3人で一緒に話し合いをすることは不可能)いろいろ不都合なことも増えた。しかし、Mike と Gene に接して両者からそれぞれ全く違ったやり方のサイエンスを学ぶことが出来た。しかも、両者ともに、サーカディアンリズム研究の分野で成功しているサイエンティストである。彼らが、日本語を読めないことを幸いに、気兼ねなく自由に私の感じたことを書いてみたいと思う。

Mike と Gene 両者に共通していることは、Colin S. Pittendrigh から多大な影響を受けていることだろう。Mike がサーカディアンリズムの研究を始めたのは、Pittendrigh (当時 Princeton 大学)の大学院生だったからで、コウモリの冬眠を利用して、恒温動物のコウモリのサーカディアンリズムに温度補償性があることを示した(Menaker 1959)。Gene は、Stanford 大学心理学部の学部学生の時、ヒトの視覚に関する研究をしていたが、そのテーマが好きになれず、他の研究室をいろいろ回って歩き、サーカディアンリズムを研究している M. Gordon-Lickey の研究室の大学院生となった。その当時 Pittendrigh は、まだ Princeton 大学にいたが、Stanford へ移る準備をしていて、Gene は彼にいろいろ影響を受けた。Gene は、アメフラシのサーカディアンリズム研究で学位を取った後(Block and Lickey, 1973)、Pittendrigh (当時 Stanford 大学)のポストドクとなった。しかし、アメフラシがもっとも良いモデルであるとは思えなかったために、他の軟体動物から、より優れたモデルを探すということを決めた。ナツメガイに出会い、その後バージニア大学に就職した後もナツメガイの眼のサーカディアンペースメーカーの細胞レベルでの研究を続けている(Block and Wallace, 1982)。テクニックも一貫して電気生理中心である。

それに対し、Mike は、個体レベルから生態レベルに興味があり、植物こそ扱わなかったものの、昆虫、トリ、トカゲ、魚、ほ乳類と様々な動物種を用い、活動リズム、ホルモン測定、電気生理といろいろなア

ブローチでサーカディアンリズム、光周性の研究をしている。

ラボの運営の方法は、まるで異なり、Gene は事細かに実験計画からグラントの申請、テクニシャンやポストドクの雇用に至るまでラボミーティングで話し合う。これは、実際に実験するのはポストドクであり大学院生であるので、これらの人に影響を及ぼす決断をする場合は、まずこれらの人に了解を得ることが先であるという考えからであろう。また、Gene はグラントに申請した実験計画は出来るだけ忠実に実行しようと努力している。Mike は、ポストドクや大学院生にはかなり自由勝手に研究をさせているが、人事やグラントの申請となるとポストドクや学生には全く相談せず独自に決める。グラントに申請した実験計画を後に我々が知り、一体誰が実験するのだと質問すると、「誰もやってくれなかったら誰か探し、見つからなかったらやらなくてもいいよ」とまで言う。これは、お金を取ってくるのと人事といったことは彼の仕事で、我々は研究だけを行っていればよいのだ、という考えからであろうか。

実験に対する姿勢も違い、Gene は今でも時間をみつけては、新しい学生に電気活動のリズムを記録する標本の作り方を教えている。時間があれば自分で手を下したいタイプである。Mike は実際に手を動かすよりも、いろいろな所から仕入れてきた情報からあれこれ考え、ストーリーを展開するのが好きなようである。事実、かなり前から、自分で実験をすることから遠ざかっていたようである。しかし、データを見る能力はさすがにすごく、私が持っていった紙切れ一枚のデータからいろいろな情報を即座に読みとり、新しい仮説を立て、それを証明する実験を考える。私は別のプロジェクトで、ハムスターの眼(第2のサーカディアンオシレーター)の座が活動リズムや光周性におよぼす影響を調べている。この実験にいたる過程を少し述べると、Russell が持っていた眼のロッドがないトランスジェニックマウスの位相反応実験を私が解析していて、この動物が野生型よりも活動時間が長いことを見つけた。Russell の rd マウスのデータを見直してみると(Foster et al., 1991)、

このマウスではみられない。すぐに Mike と相談した。そして、これは発生(発育)段階で眼が何らかの影響を SCN に与えている可能性を示しているから、ハムスターを使って生後違った時期で眼を除去してその影響を見てみようということになった。バージニア大学の場合、許可なしで新しい方法での動物実験は許されておらず(*In vitro*は全く問題ないが)、動物実験を管轄している大学の組織に計画を申請して許可を得なければならぬ。その許可番号なしでは、動物を買うことすらできないし、無許可で実験をしたことがその組織に知れると、研究室の一切の動物実験を禁止される。眼を取ることの必要性を説明し、詳しい手術法を記載した申請書を提出した。生まれて直後の動物は麻酔薬を用いることができず、低温麻酔(氷の中に体をいれる)を施すこととしたが、それが問題となった。低温麻酔は麻酔ではないというのである(動物が痛みを感じる可能性が高いという)。しかし、それに変わる方法は見つかることが出来ず、結局毎月定期的にデータベースを検索してそれに変わる新しい良い方法を探すということで、とりあえず低温麻酔は許可された。申請してから2カ月後である。実験が遅れたことはある面で幸いした。イグアナの眼や、松果体を培養していた Gianluca Tosini が、突然ほ乳類の眼の培養をすと言い出した。これまでに、ほ乳類の眼に見られるサーカディアンリズムは、SCN 破壊後も続くことが示されていたが(Terman et al., 1993)、直接眼の中にサーカディアンオシレーターが存在することを示唆した実験はなかった。Gianluca はこれを直接証明したいと言い出したのだ。ラボにいたすべての人(私を含め)が、ほ乳類の眼は、ニワトリやカエルやイグアナとは違って培養は難しいし、たとえ培養できたとしてもメラトニンのリズムを検出するなんて無理だと冷たい態度を示した。Mike だけは、違っていた。「クレージーな実験を10回やって、その中の一個がもし成功したらおまえはラッキーだ」といい、「今の系をそのまま使えて、ただ材料をかえるだけの簡単な実験なので、試してみない理由はない」と言い切った。結果は、Science 誌に載った(Tosini and Menaker,

1996)。この実験結果は、ハムスターの網膜にサーカディアンオシレーターがあることを示していて、私の実験に、眼のオシレーターが SCN のサーカディアンペースメーカーにおよぼす影響を見るという付加価値を付けてくれた。しかし、いざ実験を開始して2カ月が経過しても、恒暗においたインタクトとの違いを見つけることができなかった。Mike へ結果がネガティブだから実験を終了することを告げにいった。しかし、Mike はそのことに反対した。いままで動物を維持してきた費用や、私と学部学生が動物の世話に費やした時間が、ここで実験をやめるとすべて無駄になる。少なくとも後1カ月は動物を維持し、ネガティブだと言いつける結果を出すべきだというのである。そうすれば、我々の仮説を書いて、しかしそれは間違っていたという論文を発表できる。そして、それはサイエンスにも貢献するというのだ。Mike の意見に従い、実験をやめなかった事が幸いした。1カ月後、違いが見え始め、2カ月後それらは、有意な違いとなった。また、Mike はその動物の脳、少なくとも SCN がどうなっているか調べることを提案した。半年も動物を恒暗条件下で維持するような実験は再度行うことは非常に大変なので、脳を取り出す位相もそろえ、条件を徹底的にそろえたサンプリングを行えというのである。半年間もフリーランした動物である、位相は個体間でバラバラで、私は24時間動物室へ留まって動物を灌流固定した。次に、インタクトのコントロールをどうするかが問題となった。私は赤外線照明下で動物を麻酔し、眼を除去してから明るい部屋で灌流する方法を提案した。Mike はその方法に同意したが、もしかして問題があるかもしれないので、眼に詳しい Block ラボのポスドクに相談しようという。ポスドクによると、眼を除去するという事は視神経を切断することであり、それは一番強い刺激であるという。つまり、それは直射日光下で動物を灌流固定していると同じ事であろうという。何事もその道に詳しい者に聞けという Mike の姿勢が正しかった。インタクトの動物はインタクトのまま赤外線照明下で麻酔し、頭を黒い布で覆い、部屋の電気をつけ灌流するという方法を取った。これらの

実験結果は、長編論文にすることにはできるだけではなく、新しいグラントを3つ申請する材料となった。我々研究者との関わり方も両者は少し違う。Geneは、少しでも時間があれば、ラボへやってくるが、Mike はあまりそういった事はせずに、こちらからデータをもって話しに行かない限り、向こうから聞いてくることはあまりない。しかし、思いついた時いつでもオフィスへ行くと、実験結果を話し合うことが可能である。このことは、予期しなかった実験結果が出た時、次にどうするかを相談する時によい。In vivoの実験はその場に合わせた臨機応変な判断が大切なのである。Geneの場合は、スケジュールがかなり事細かに組まれており、そのスケジュールはインターネットを通してみんなが見ることが可能である(パスワードは必要)。そして、アポイントメントを取る場合もスケジュール表にアクセスして、あいている時間を見つけて、そこに自分の名前を書き込む。もし Gene が了解した場合はそのまま名前が残るが、そうでないと消されてしまう。そこで、一番確実なコミュニケーション手段は電子メールとなってしまふ。

集まってくる大学院生やポスドクのタイプもかなり違うようで、Block ラボには長期滞在型が多く、ポスドクだった S. B. S. Khalsa は11年、S. Michel は6年、M. Geusz は8年いた。大学院生だった M. Roberts は6年、D. Whitmore は8年もいた。また彼らの中の幾人かは、職を得た今でも定期的に(1年に1カ月といったペースで)帰ってきて実験を続けている。Menaker ラボには長期滞在した人は少なく、一番長いのは大学院生の M. Max で8年間である。しかし、Mike の下で育った研究者の名前をあげると、Mike がいかに多くの現在のサーカディアンリズムの研究をリードしているサイエンティストを育てたかがよく分かる。大学院生:A. Eskin, H. Underwood, J. Elliott, J. S. Takahashi, V. M. Cassone, M. R. Ralph, F. C. Davis, G. M. Cahill, M. Max, C. S. Colwell, ポスドク: F. W. Turek, D. A. Foa, G. E. Pickard, R. G. Foster, D. J. Hudson, A. S. I. Loudon, 学部学生:C. H. Johnson。日本人では、海老原先生(名古屋大

学)、大島さん(塩野義製薬)、下村さん(J. Takahashi ラボ)、私、梅津さん(国立環境研究所)、千葉さん(上智大学)、後藤さん(名古屋大学)となる。自分でアイデアがあり自分で実験を立ち上げるタイプの人はMenakerラボでうまくやっけて行けるが、テクニックを学びたいといった指導を期待するタイプはうまくやっけて行けないようである。先にあげなかったBlockラボのポストドクで、現在サーカディアンリズムの分野で活躍中の人は、M. Ralph, N. Wayne, C. Colwell, A. Millar などであろうか。日本人は、富永さん(大阪大学)、浜田さん(通産省工技院)、篠原さん(横浜市立大学)が短期間滞在した。

我々ポストドクは、研究のみを行っていればよいとはいえず、セミナー、授業、グラント申請のネタをボスへ提供しなければならぬ。Mikeの場合は、いろいろ突然ひらめくことが多いらしく、急に、「明日までに(ひどいときは今日の午後までに)おまえの結果でこういったグラフを作ってくれ」といった依頼が多い。Geneは計画的で、かなり前から打診してくる。以前こんな事があった。Geneから、昼休みにピザがあるので食べに来てくれといった手紙をもらった。行ってみると多くのポストドクと大学院生が招待されており、Geneは我々がピザを食べ終わった頃やってきて、「実は来月に時間生物学センターの延長の審査があり、審査員がセンターのサポートを受けている大学院生とポストドクに話しを聞くことを予定しているので、どうかよろしく頼む」という。やり方は、日本的で「根回しをする」という言葉が適切である。去年、わたしがサポートを受けている米空軍グラントの中間報告会があり、MikeもGeneもそれぞれ成果を発表しなければならず、私にデータのスライドを作ってくれと言ってきた。Geneが予定を組んでどちらが何を発表するかを3人で話し合った。それは、報告会の1カ月前であった。私は、1週間ぐらい前までにスライドを作成し両者に渡しておいたのだが、その後Geneから電話があつて、詳しい実験内容を知りたいし発表の練習をしたいので、時間を作ってくれという。一通り詳しい実験の条件や、データについて説明してその場は終わったが、

Mikeによると発表の前日Geneがかかなり神経質になっていて、答えられない質問をされたらどうしようとMikeに相談してきたそうである。Mikeは、もし答えられなかったら、詳しいことは分からないので実験を行った山崎に聞いてみると言えということで、その場は納得したとのことである。でも、私が朝ラボへ行くと、質問されたら答えられないことがあるので教えてほしいといった電子メールがGeneから入っていた。とにかく、Geneはまじめなのである。私は、論文の下書きを両者へ渡してあるのだが、Geneは会う度に「まだ、読み終わっていないのだけど、努力するから申し訳ないけど待っていてくれ」と本当に申し訳なさそうに言うが、Mikeは、こちらから質問しても、「うーむ、まだ読んでないから」と簡単に流されてしまう。でも、毎日しつこく言っても決して気を悪くしない。授業のやり方も違う。私は両者の授業を聞いたことはまだないのだが、Geneは時間をかけて準備しているようである。しかし、私はMikeが授業の準備をしているのを見たことはない。時間生物学の授業などは、Geneは図はすべてパワーポイントで準備した。Mikeは学会発表のスライドの流用である。しかし、両者に共通していることは、内容は常にアップデートしていることである。授業のプリントをみると、一ヶ月前に発表した論文を取り上げていた。Mikeは、講義は全くの素人(学部生の一般授業)か、全くの専門家へするのが面白いと言っていた。全くの素人からは思いがけない質問を受けることがあり、かなり違った角度からアイデアを得ることがあるからだそうである。アメリカの場合、講義は一方的ではなく、教授は質問の時間を他に設けなければならない、後日オフィスへ授業の内容が理解できなかつたり、質問がある学生が尋ねてきて個人面談となる。

ラボミーティングのやり方を見てもそれぞれの個性がよく見られる。Blockラボは、よくオーガナイズされていて、毎週トピックスを設ける。注目すべき論文が発表されればそれを紹介し、細かい方法に至るまで徹底的に話し合う。そこから、新しいアイデアが生まれる。論文を投稿する前にもラボミーティングで話し合う。去年は、ラボのみならず分担任して時間

生物学の授業を行った。かなりの時間をミーティングにあてた。Menaker ラボは、全くオーガナイズされていない。Mike は雑談を好み、トピックスなしのミーティングがよくある。なにが起きるか予期できない。昨年は試験的にミーティングをオーガナイズしようと試みた。メンバーがまわりもちでその週のミーティングを担当する。しかし、内容は個人の自由で論文を紹介してもいいし、実験結果か実験計画を発表してもいいというものだった。

サイエンスにおける貢献度を比較すると、2人の年齢が14歳も違うので(Mike:1934年生まれ、Gene:1948年生まれ)、直接は比較できないし、発表した論文の総数や雑誌のクオリティーで業績を判断できると思えないが参考までに記すると、1996年の資料で、Mikeは153編、Geneは74編となっている。それらの内、Nature, Science, PNAS誌に発表されたものを数えれば、Mike、28編、Gene、4編となっている。Mikeは現在特に要職についていないが、Geneは時間生物学センターのDirector、Gordon Conference on ChronobiologyのChairman、Society for Research on Biological RhythmsのPresidentである。Mikeは、バージニア大学の生物学部へ学部長としてオレゴン大学からやってきたのだが、Geneがバージニアにいたことが大きな理由の一つであると言っていた。

さて、本題のSCNである。両者がなぜSCN研究を始めたか聞いてみた。Geneの場合明瞭で、アメフラシとナツメガイの実験結果から築いたモデル(Block et al., 1996)がほ乳類にも当てはまるかどうか試すために、SCNの培養を始めたそうである。また、その他の大きな理由として、ほ乳類だと大きなグラントが取りやすかったためでもあったと述べていた。S. KhalsaとM. Geuszが基盤電極の上でSCNの培養を試み、E. Herzogがそれを引き継いだ(Herzog et al., 1997)。M. Geuszは、医学部のR. Dayと当時こちらにいたS. Kayとの共同でc-fosのリズミックな発現をルシフェレースによってリアルタイムでモニターした(Geusz et al., 1997)。常に新しい技術を取り入れようとするGeneの姿勢がみられる。

Mikeの場合、少し複雑で、J. Takahashi(1982)がトリのSCN破壊実験を行った。複数ペースメーカーがどのように調和しているか(周期決定、温度補償性)がMikeの興味である。こういったサーカディアンシステムの研究はトリ、マス、トカゲと来て、現在はイグアナ(Tosini and Menaker, 1998)とヤツメウナギ(Menaker and Tosini, 1996)が彼の中心的な興味である。彼は、常にサーカディアンリズムの進化を考えているのである。ハムスターの研究は光周性の実験で始められ、世界に先駆けハムスターに光周反応があることを示した(Gaston and Menaker, 1967)。その後、J. Takahashiら(1984)が、ハムスターの活動リズムの位相反応の光スペクトルカーブを求めた。ほ乳類のSCNを始めたのは、かなり後でG. Cahillがスライス標本で薬理実験をした(Cahill and Menaker 1989a, b)。その後、タウミュータントを見つけたこと(Ralph and Menaker, 1988)を機に、野生型のSCNと交換移植を行った(Ralph et al., 1990, Vogelbaum and Menaker, 1992)。こうしてみると、両者に共通しているのは、SCN研究は、サイドプロジェクトの中の一つであるということである。それぞれ、モデルシステムを持っていて、ほ乳類のSCN研究は、これらの比較対象である。こんな状況のなか、両教授が、自由行動下の動物からSCNの活動を記録する重要性を認めてくれたことを感謝している。2大教授の比較教授学、実は、両教授の親や子供、家や車、そして普段の服装、パーティーのしかた、等々を比較するともっと2人の違いが見えてくるのだが、個人情報の公開は今回は差し控えておきたい。

(さて、本稿のはじめに述べたように、ここで私がSCN研究で楽しんでいる2つの問題について述べることとする)

私がSCN研究で、一つ疑問に思っていることは、多くの人がD. K. Welshら(1995)の論文を「SCNの一つ一つの神経細胞がサーカディアンオシレーターであることを示した」と引用していることである。孫引きによって誤引が始まることはありえるが、共著者の

S. M. Reppert 自身がそのように引用していること (Liu et al., 1997) に私はかなり疑問を感じる。Welsh は、ラットの胎児の SCN を電極基盤上に分散培養し、個々の神経細胞がそれぞれ違った周期でフリーランすることを示した。また、TTX 存在下では、スパイクが抑制されリズムが測定できないが、それを洗い流した後再び現れたリズムの位相は、TTX を与える前のリズムの位相の延長上にあった。これらの結果から彼らは、SCN の一つ一つの神経細胞にサーカディアンリズムを刻む能力がある可能性を示唆した。しかし、一般に分散培養した個々の神経間はシナプスを形成しており (Ichikawa et al., 1991, Kuroda et al., 1992, Muramoto et al., 1993)、グリア細胞間にはギャップジャンクションがみられる (van den Pol et al., 1992, Welsh and Reppert, 1996)。最近、SCN の神経細胞間にもギャップジャンクションが存在することが確認された (Jiang et al., 1997a, b)。また、SCN の神経細胞間で、TTX 存在下でも同期した神経活動が存在することが報告されている (Bouskila and Dudek, 1993)。Welsh らは、一つの神経細胞から電気活動を記録しているものの、その細胞が TTX 存在下でも、他の細胞とカップリングしている可能性は十分考えられる。Herzog ら (1997) は、同様の方法でマウスの SCN のスライスカルチャーから、電気活動を記録した。個々の神経のサーカディアンリズムは、ほとんどが同位相か反対位相で同期していた。これらの結果の違いは、培養方法の違いから生じたのかもしれない。両者に共通していることは、同じ電極から2つ以上のユニットが記録できることで、彼らはスパイクの波形によってシングルユニットを分別している。この方法は、スパイクの波形は、常に一定であることを前提としているが、波形がサーカディアン変化していることも十分考えられる。

SCN 以外でも、近年いくつかのグループが「サーカディアンリズムは細胞の性質なのか、それとも細胞間のネットワークなのか」という問題に挑戦した。J. Takahashi らは、ニワトリの松果体の細胞1つを培養し、メラトニン放出の日内変動を測定した (Takahashi, et al., 1989)。しかし、恒暗条件での実験はなされて

いない。Pickard と Tang (1993) はトカゲの松果体を分散培養して、分泌されるメラトニン量をメラトニンに抗原性をもつ赤血球が壊される反応で調べ、それにサーカディアンリズムがあることを示した。しかし、個々の培養細胞は接してはいないが、液性の連絡が存在している可能性は否定できない。Michel ら (1993) はナツメグイのサーカディアンペースメーカーである網膜基底細胞を一個一個違う培養皿で培養し、それらの細胞膜のコンダクタンスがサーカディアン変動することを示した。しかし、この結果は同一細胞から記録されたものではない。ごく最近、中原ら (1997) が、ニワトリの松果体の一つ一つの細胞を別々に培養し、恒暗条件でもメラトニン放出にサーカディアンリズムがあることと、そのリズムが光に同調することを示した。これらの結果は、多細胞生物でも単一細胞内 (サーカディアンペースメーカーの) にリズムを刻む能力が存在することを強く示唆しており、SCN も例外ではないと考えることは自然なことかもしれない。しかし、ここで、バクテリアからヒトに至るまで、すべて同じメカニズムで説明しようとする考えを見直してみようと思う。SCN は、他のサーカディアンペースメーカーと明らかに異なる特徴がある。それは、光感受性である。ナツメグイの網膜基底細胞は、サーカディアンペースメーカーであり光に同調できる (Block et al., 1996)。ニワトリの松果体も、そうである (Nakahara et al., 1977)。カエルの網膜の視細胞も、同一細胞内かどうかはわからないものの、サーカディアンオンシレーターと光受容性の両方の機能がある (Cahill and Besharse, 1995)。しかし、SCN にはそれがない。トリやイグアナで、脳内に光受容器が見つけれられたが septum 近辺であり、SCN とは離れている (Grace et al., 1996)。SCN は例外である。そうだとすれば、SCN と他のペースメーカーが同じメカニズムで時を刻んでいると考える必然性もないように思える。

ここでもう少し柔軟に、ネットワーク仮説を検討しても良さそうではないか。数理モデルでは、短い周期 (ウルトラディアンリズム) を組み立てて、長い周期 (サーカディアンリズム) をつくる「ネットワーク仮説」

は、Pavlidis が 1969 年に提唱した。このモデルの問題点は、最終的に出てくるサーカディアンリズムの安定性である。しかし、階層構造の工夫でこの問題は解決されつつある (Barrio et al., 1996)。Davis と Gorski (1984) は、ハムスターの SCN の部分破壊を行い、90% の SCN を壊しても活動リズムは継続することを示した。しかし、周期と SCN の体積にきれいな相関関係があり、SCN が多く壊された場合は、周期が短くなった。私は、ラットの胎児の SCN を含む視床下部を分散培養し、細胞内カルシウムのウルトラディアンリズムを測定した (Yamazaki et al., 1995a)。視床下部細胞のカルシウムオシレーションは、大脳皮質細胞のそれと異なり、TTX 存在下でも継続し、重水によって周期が延長するサーカディアンリズムと似た特徴があった。この結果は、ネットワーク仮説に有利なもの、それを肯定も否定もできない。数理的に、ウルトラディアンリズムとサーカディアンリズムはとてもよく似た特徴がある (Goldbeter, 1996)。同じ組織から得られた2つの異なるリズムが、それらがまったく別のメカニズムで発生していても、特徴が似ていることは十分考えられるからである。先に述べたが、自由行動条件下のハムスターの SCN からは、サーカディアン、ウルトラディアンの両方の電気活動リズムを測定できる。しかし、活動リズムが20時間のタウミュタントハムスターでは、サーカディアンリズムは短くなっているが、ウルトラディアンリズムは短くなっていない (Yamazaki et al., 1996b)。この結果は、ネットワーク仮説を支持しないように思えるが、タウミュレーションが細胞間のカップリングに影響をおよぼしていると考え、ウルトラディアンリズムの周期が同じでも最終的に出てくるサーカディアンリズムの周期が変化することもありうる。活動リズムが20時間のハムスターのタウミュタントでは、SCN、網膜両方ともに20時間のリズムを示す (Davies and Mason, 1994, Liu et al., 1997, Tosini and Menaker, 1996)。違った組織で、同様にミュレーションが働いていることは、リズム発振メカニズムが細胞内に存在すると考えると理解しやすいようである。総括すると SCN でも細胞内にリズム発振機構が

存在しているとするとほうに有利な結果が多いようであるが、ドグマを無理矢理作り上げるよりも、いろいろ可能性を考える方がサイエンスを楽しめると思うのだが。でも、ドグマを崩すのもサイエンスの別なたのしみでもあることも事実である。

私が、楽しんでいるもう一つのテーマはEオシレーターとMオシレーターがどこにあるかということである。EM2オシレーターモデルは、Pittendrigh と Daan によって 1976 に提唱された。Eオシレーターは活動開始の位相、Mオシレーターは活動終了の位相を支配する。ハムスターを恒明条件下へ置くと、活動リズムが二つに分割し(スプリット)、180度の位相角関係で安定する。これは結合した2つのリミットサイクルオシレーターの分岐理論で説明できる (Kawato and Suzuki, 1980)。その後、森ら (1986) は、ハムスターの光パルス投与後の位相変位の移行期から2オシレーターのパラメータをすべて計算し、そのパラメータを基に実際に計算機上に結合した2つのオシレーターを組立て、ハムスターのいくつかの実験結果(位相反応の移行期、2パルス実験、光周期性等)をシミュレーションすることに成功した。また、話がわき道にそれてしまうが、2オシレーターモデルを常に検証しているのが、J. Elliott である。しかし、彼は全然論文を書かないのである。Pittendrigh と共に行った大変興味深い実験もまだ発表されていない。私がタウミュタントハムスターで2オシレーターモデルを検証したとき (Yamazaki et al., 1995b)、彼が未発表のデータの束を送ってくれたので、私は彼の興味深い実験を知ることができた。Mike は、これはひどい見本なので、絶対まねをしないようにと強調した。

さて、この推測された2つのオシレーターは実際に脳のどの場所に存在するのであろうか？この問題に最初に取り組んだのは、Pickard と Turek (1982) である。彼らは、恒明条件下でスプリットしているハムスターの片側の SCN を破壊し、2つの活動リズムの中の1つが消滅したことを見つけた。しかし、その後、彼らは SCN の近傍を破壊しても同様な結果がみられることを報告している (Pickard and Turek,



1983)。Davis と Gorski(1984)は、あらかじめ片方の SCN を破壊しておいたハムスターを恒明下へ置くと、活動リズムがスプリットすることを見つけた。しかし、みられたスプリットは、正常個体のものとやや異なり、2つのコンポーネントが同じ大きさではなく、片側が大きかった。Zlomanczuk ら(1991)は、スプリットしているジャンガリアンハムスターの SCN を取り出し、その電気活動を測定し、左右の SCN とともに2峰性のリズムを示すことを発表した。しかし、SCN スライス標本は左右2つに分けられておらず、SCN 神経間が強くカップリングしていた場合、もし左右の SCN がそれぞれEとMオシレーターであったとしても、片側の SCN が2峰性のリズムを示すことも考えられる。篠原ら(1995)は、ラットの SCN をスライス培養し、放出される神経ペプチドのリズムを測定した。測定したVIP と AVP 共にサーカディアンリズムを示し、2つのリズムは同期していた。しかし、薬によりグリア細胞の増殖を抑えると、2つのペプチドのリズムの同期は見られなくなった。VIP と AVP がEとMオシレーターなのであろうか？もう一つの可能性は、EMオシレーターがともに同一細胞内に存在することである。ごく最近、ショウジョウバエの時計遺伝子と考えられている *per* の相同遺伝子がマウスでクローニングされた(Tei et al., 1997, Sun et al., 1997)。さらに、この *mper1* と相同性のある *mper2* がクローニングされた(Albrecht et al., 1997, Shearman et al., 1997)。これらの遺伝子は、サーカディアンペースメーカーである SCN と網膜の両方でリズムに発現しており、興味深いことに SCN での *mper1* と *mper2* の位相が4時間ほどずれていて、光に対する反応性も異なる。(Albrecht et al., 1997, Shearman et al., 1997, Shigeyoshi et al., 1997)。この位相差と光応答性が違う特徴は、森らの求めた理論上の結果と似ている。ペプチドのグループにせよ細胞内(遺伝子)にせよ、もし、左右の SCN にそれぞれEとMオシレーターの両方が存在するとなると、左右両側にあるEオシレーター群とMオシレーター群がそれぞれ別々にカップリングしたうえで、さらにE群とM群がカップリングしなければならぬ。そうでないと、スプリッティ

ングが説明できない。この構造はかなり複雑である。ここで私の電気生理の研究へ戻るが、このような問題も、インタクトの SCN から同時に測定されたデータを詳しく解析することで、なにか分かってくるのではないかと思っているのであるが、いかがであろうか？

## 引用文献

- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. and Lee, C. C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064.
- Barrio, R. A., Zhang, L. and Maini, P. K. (1996) Hierarchically coupled ultradian oscillators generating robust circadian rhythms. *BMB* 96-02: 1-11.
- Block, G. D. and Lickey, M. (1973) Extraocular photoreceptors and oscillators can control the circadian rhythm of behavioral activity in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 84: 367-374.
- Block, G. D. and Wallace, S. F. (1982) Localization of a circadian pacemaker in the eye of a mollusc, *Bulla*. *Science* 217: 155-157.
- Block, G. D., Geusz, M., Khalsa, S. B., Michel, S. and Whitmore, D. (1996) Circadian rhythm generation, expression and entrainment in a molluscan model system. *Progress in Brain Res.* 111: 93-102.
- Bouskila, Y. and Dudek, F. E. (1993) Neuronal synchronization without calcium-dependent synaptic transmission in the hypothalamus. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3207-3210.
- Cahill, G. M. and Menaker, M. (1989a) Responses of the suprachiasmatic nucleus to retinohypothalamic tract volleys in a slice preparation of the mouse hypothalamus. *Brain*

- Res. 479: 65–75.
- Cahill, G. M. and Menaker, M. (1989b) Effects of excitatory amino acid receptor antagonist on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys. *Brain Res.* 479: 76–82.
- Cahill, G. M. and Besharse, J. C. (1995) Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog. Retinal and Eye Res.* 14: 267–291.
- Davies, I. R., and Mason, R. (1994) Tau-mutant hamster SCN clock neurons express a 20 h firing rate rhythm *in vitro*. *Neuroreport* 5: 2165–2168.
- Davis, F. C. and Gorski, R. A. (1984) Unilateral lesions of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J. Comp. Physiol. A* 154: 221–232.
- Foster, R. G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W. and Menaker, M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J. Comp. Physiol. A* 169: 39–50.
- Gaston, S. and Menaker, M. (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158: 925–928.
- Geusz, M. E., Gletcher, C., Block, G. D., Straume, M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kay, S. A. and Day, R. N. (1997) Long-term monitoring of circadian rhythms in *c-fos* gene expression from suprachiasmatic nucleus cultures. *Current Biology* 7: 758–766.
- Goldbeter, A. (1996) From ultradian biochemical oscillations to circadian rhythms. In: *Membranes and circadian rhythms* (Th. V. Driessche, ed), pp68–93. Berlin : Springer-Verlag.
- Grace, M. S., Alones, V., Menaker, M. and Foster, R. G. (1996) Light perception in the vertebrate brain: an ultrastructural analysis of opsin and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the iguanid lizards. *J. Comp. Neurology* 367: 575–594.
- Herzog, E. D., Geusz, M. E., Khalsa, S. B. S., Straume, M. and Block, G. D. (1997) Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates. *Brain Res.* 757: 285–290.
- Ichikawa, M., Kuroda, J., Yasui, K. and Kuroda, Y. (1991) Expression of synaptophysin during synapse formation between dissociated cortical neurons. *Neurosci. Res.* 12: 452–458.
- Inouye, S.-I. T. and Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5962–5966.
- Inouye, S.-I. T. and Kawamura, H. (1982) Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.* 146: 153–160.
- Jiang, Z.-G., Yang, Y., Liu, Z.-P., Allen, C. N. (1997a) Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J. of Physiol.* 499: 141–159.
- Jiang, Z.-G., Yang, Y., Allen, C. N. (1997b) Tracer and electrical coupling of rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neurosci.* 77: 1059–1066.
- Kawato, M. and Suzuki, R. (1980) Two coupled neural oscillators as a model of the circadian pacemaker. *J. Theor. Biol.* 86: 547–575.
- Kuroda, Y., Ichikawa, M., Muramoto, K., Matsuda, Y., Ogura, A. and Kudo, Y. (1992) Block of synapse formation between cerebral cortical neurons by a protein kinase inhibitor. *Neurosci. Lett.* 135: 255–258.
- Liu, S., Weaver, D. R., Strogatz, S. H. and

- Reppert, S. M. (1997) Cellular construction of circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91: 855-860.
- Meijer, J. H., Watanabe, K., Detari, L. and Schaap, J. (1996) Circadian rhythm in light response in suprachiasmatic nucleus neurons of freely moving rats. *Brain Res.* 741: 352-355.
- Meijer, J. H., Schaap, J., Watanabe, K. and Albus., H. (1997) Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: *in vivo* versus *in vitro* models. *Brain Res.* 753: 322-327.
- Menaker, M. (1959) Endogenous rhythms of body temperature in hibernating bats. *Nature* 184: 1251-1252.
- Menaker, M. and Tosini, G. (1996) The evolution of vertebrate circadian system. In: *Circadian organization and oscillatory coupling* (Honma K, Honma, S, eds), pp39-52. Sapporo, Japan: Hokkaido VP.
- Michel, S., Geusz, M. E., Zaritsky, J. J. and Block, G. D. (1983) Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 259: 239-241.
- 森すみ子、川人光男、鈴木良次 (1986) ハムスターの位相変位データにもとづく定量的2振動体モデル. *MBE* 85-88: 67-76.
- Muramoto, K., Ichikawa M., Kawahara, M., Kobayashi, K. and Kuroda, Y. (1993) Frequency of synchronous oscillation of neuronal activity increases during development and is correlated to the number of synapses in cultured cortical neuron networks. *Neurosci. Let.* 163: 163-165.
- Nakahara, K., Murakami, N., Nasu, T., Kuroda, H. and Murakami, T. (1997) Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin-synthesizing capacities *in vitro*. *Brain Res.* 774: 242-245.
- Pavlidis, T. (1969) Populations of interacting oscillators and circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 22: 418-436.
- Pickard, G. E. and Turek, F. W. (1982) Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science* 215: 1119-1121.
- Pickard, G. E. and Turek, F. W. (1983) The suprachiasmatic nuclei: two circadian clock? *Brain Res.* 268: 201-210.
- Pickard, G. E. and Tang, W.-X. (1993) Individual pineal cells exhibit a circadian rhythm in melatonin secretion. *Brain Res.* 627: 141-146.
- Pittendrigh, C. A. and Daan, S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J. Comp. Physiol.* 106: 333-355.
- Ralph, M. R., Menaker, M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241: 1225-1227.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Koiakowski, L. F. and Reppert, S. M. (1997) Two period homologs: circadian expression and photoic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261-1269.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C. and Okamura, H. (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *per1* transcript. *Cell* 91: 1043-1053.

- Shinohara, K., Honma, S., Katsuno, Y., Abe, H. and Honma, K. (1995) Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7396-7400.
- Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchjenko, O., Bailey, J., Eichiele, G. and Lee, C. C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 90: 1003-1011.
- Takahashi, J. S., and Menaker, M. (1982) Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Neurosci* 2: 815-828.
- Takahashi, J. S., De Coursey, P. J., Bauman, L. and Menaker, M. (1984) Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature* 308: 186-188.
- Takahashi, J. S., Murakami, N., Nikaido, S. S., Tratt, B. L., and Robertson, L. M. (1989) The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second messenger, and macromolecular synthesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 45: 279-352.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. and Sakaki, Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389: 512-516.
- Terman, J. S., Reme, C. E. and Terman, M. (1993) Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 605: 256-264.
- Tosini, G. and Menaker, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419-421.
- Tosini, G., Menaker, M. (1998) Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, Iguana iguana. *J. Neurosci.* 1998 18 (3): p. 1105-1114.
- Vogelbaum, M. A. and Menaker, M. (1992) Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. *J. Neurosci.* 12: 3619-3627.
- van den Pol, A. N., Finkbeinker, S. M. and Cornell-Bell, A. H. (1992) Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia *in vitro*. *J. Neurosci.* 12: 2648-2664.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. and Reppert, S. M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
- Welsh, D. K. and Reppert, S. M. (1996) Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706: 30-36.
- Yamazaki, S., Maruyama, M., Cagampang, F. R. A. and Inouye, S.-I. T. (1994a) Circadian fluctuations of cAMP content in the suprachiasmatic nucleus and anterior hypothalamus of the rat. *Brain Res.* 651: 329-331.
- Yamazaki, S., Ishida, Y. and Inouye, S.-I. T. (1994b) Circadian rhythms of adenosine triphosphatase contents in the suprachiasmatic nucleus, anterior hypothalamic area and caudate putamen of the rat—negative correlation with electrical activity. *Brain Res.* 664: 237-240.
- 山崎 晋 (1995) National Science Foundation Center for Biological Timing, Michael Menaker 研究室 比較生理生化学 12: 271-274.
- Yamazaki, S., Inouye, S.-I. T. and Kuroda, Y. (1995a) TTX-resistant  $Ca^{2+}$  oscillation in cultured hypothalamus: similarity to the mammalian circadian pacemaker. *Neuroreport*

6: 1306-1308.

- Yamazaki, S., Shimomura, K. and Menaker, M. (1995b) Phase relationship of evening and morning oscillators regulates phase responsivity: comparative study between wild-type and tau mutant hamsters. Soc. Neurosci. Abst. p954.
- Yamazaki, S., Kerbeshian, M. C., Hocker., C. G., Block, G. D. and Menaker, M. (1996a) Ultradian and circadian rhythms in neural activity in and outside the suprachiasmatic nucleus of wild type and tau mutant hamsters. SRBR Abst. p63.
- Yamazaki, S., Kerbeshian, M. C., Hocker., C. G., Block, G. D. and Menaker, M. (1996b) Phase relationships in ultradian and circadian rhythms between the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. Soc. Neurosci. Abst. p2056.
- Yamazaki, S., Alones, V. E., Block, G. D. and Menaker, M. (1997) Functional connection between the circadian and motor systems. Soc. Neurosci. Abst. p790.
- Zlomanczuk, P., Margraf, R. R. and Lynch, G. R. (1991) *In vitro* electrical activity in the suprachiasmatic nucleus following splitting and masking of wheel-running behavior. Brain Res. 559: 94-99.