

概日リズム研究人生のはじまりとこれから

小野大輔[✉]

名古屋大学環境医学研究所

概日リズム研究との出会い

学部4年の時、私は卒業研究で「あくび」と「覚醒」の関係についてテーマを与えられた。ガラス電極を脳に挿入し、薬剤を投与しながら脳波・筋電図・心拍などを計測し、覚醒度を麻酔下で評価するものだった。私はこの研究内容に魅力を感じ取れず大学院ではもっと面白い事ができる所に行こうと考えた。いくつか調べるとすぐに「北大」「本間」「概日リズム」というキーワードが目に入ってきた。その時私はここで面白いことが出来るのではないかと思った。そして大学4年の2003年の夏に本間研一、本間さと先生の研究室に見学に行ったのである。この時のことを今でも映像で頭の中に記憶されている。この日が概日リズム研究に出会った日でもあった。ちょうどその時、北大では第一回World congress of chronobiologyが開催されており、本間研一先生が「時間があれば見ていったらいいよ」と言ってくださり、初めて学会というものに触れた。内容はまったく理解はできなかったが、何かすごいことが行われている雰囲気だけは強く感じた。私もいつかこんな場に立てるのだろうかと思ったのを覚えている。

修士課程での研究

2004年4月から正式に修士の学生として、「本間研」で研究を始めた。私は研究室に入っただけで「仮説」を立てて研究を行う基本を本間研一先生から学んだ。それに加え、本間研一先生、さと先生からは「リズム」の基本を学んだ。毎朝8時に研一先生が研究室にやってきて、Pittendrigh and Daanらの書いた1976年のリズム研究のバイブルと言っても過言でない論文を一つ一つ解説をしてくださるのである[1-5]。朝早くからという事に加え、難解な論文という事も重なり時にはうとうとしてしまった事も否定

はできないが、何とか理解をしようと必死で書かれている事を吸収していった。この「朝の本読み」なくしては今の研究スタイルはできていなかっただろう。もっとも重要かつ貴重な時間であったと言える。

幸運なことに、研究室ではその頃発光レポーターを用いた遺伝子発現計測が立ち上がったばかりであり、私はPer1-lucマウスを用いた視交叉上核からの遺伝子発現のリアルタイム計測系を使う事ができた。それと並行して、本間さと先生、白川哲夫先生、中村渉先生がすでに構築してくださった多電極ディッシュを用いた神経発火の計測系が自由に使える環境であったことから、視交叉上核のリズム研究にのめりこんで行った。そして2005年の修士の二年目で本受賞の原点となる“場”に出くわす事になる。私は、さと先生から“Cry double KO (CryDKO) マウスに視交叉上核から神経発火を計測するように”と指示を受けた。当時CryDKOマウスはリズムがないという事が定説で [6-10]、私自身この実験にどれほどの価値があるのか半信半疑であった。言われるがまま実験をしていくと、どうも信じがたいデータが出ている事に気が付く。リズムがないと言われているCryDKOマウス視交叉上核に、神経発火リズムがみられたのである。しかしそんな事はないはずであろうという勝手な思い込みで、私はデータを取っただけで修士課程を終える事となる。

空白の2年間

修士課程を終える半年前あたりから、研究者になるには海外での研究経験が必要であるという考えがでてきた。だとしたら博士号をアメリカで取ればいいのかという、今思えばなんとも無謀な事を考えたと思う。私は思い立ったら行動に移すタイプのようで、視交叉上核の研究で活躍されている

✉dai-ono@riem.nagoya-u.ac.jp

Erik Herzog博士の所にemailを送った。すぐに返事がきて、大学院の試験に合格したら入学可能な事、そして入学したらある程度の給料がでるといふ事を言われた。私はここに行くしかないと思った。この事を研一先生、さと先生に相談したのだが、このタイミングでなくてもいいのではないかというご意見をいただいた。私が逆の立場だったら同じことを言ったと思う。しかし私の強い意志を感じられた両教授は、最後には快く送り出してくださった。そして2006年にアメリカに旅立った。

アメリカに行って一番感じたことは、あまりにも自分の英語能力が低いという事だった。また文化も日本とは異なり、1,2か月は精神的にも辛かったが、少しずつ英語が使える事を実感するとそれも徐々に和らいでいった。といえども大学院に入るにはTOEFLだけでなくGRE (Graduate Record Examinations) という試験を受けて、ある一定以上のスコアが必要であった。当時の予定では試験にパスし2007年から大学院のPh.D.コースに入ることになっていたが、2007年の春あたりには試験にパスできるレベルに至ってなかった事、また経済的にもこれ以上いられないという事もあり、アメリカの大学院を断念した。

帰国の決断をした2007年の6月に研一先生、さと先生にもう一度研究をさせていただけませんかというemailを送った。すぐに返信があり、“本間です。待っています。10月から一緒に研究しましょう。”と一行だけのメッセージを受け取った。たった一行だが私の心に突き刺さるほど鋭く、ずっしりと重い言葉だった。この空白の2年を経て2008年4月から北大の博士課程に入るようになった。

博士課程での研究の再開

アメリカから帰ってきて研究を再開する事になったわけだが、一つやりかけのデータが残っていた。CryDKOマウスの神経発火リズムである。もしこれが事実であれば大変な事である。私は2005年から止まっていた実験を再開する事にした。私の実験の腕は衰えもなくすぐにデータは取れ、やはりCryDKOマウスの視交叉上核からは明瞭な神経発火リズムがみられたのである。私はGenotypingも間違いないか何回も確認をした。その後すぐにデータをまとめ論文にしようという事で研一先生、さと先生と議論を重ね論文投稿に向けて進めていった。ちなみにこのデータを初めて学会で発表したのは、2009年のゴードンカンファレンスで、その時はさと先生が発

表をされたが、私自身は同年のストラスブールで開催されたEBRSでこれらのデータを発表した。その年の暮れに論文を投稿したがそこからが長かった。

査読者との戦いから学んだこと

論文を投稿して、査読者からのコメントが届いた。コメントがざっしりと書かれたメールが送られてきた。追加実験を行い、一つ一つ丁寧に対応すれば何とかなるのだと信じ、時間をかけてrevise実験を始めていった。この間、研一先生、さと先生と3人でよく週末にデータについてのディスカッションを行ったことを覚えている。得られたデータを客観的にとらえ、考えられるメカニズムは何だろうか、どのような実験や解析を行えばそれらを証明する事が可能かを議論した。時には朝から始まり途中でご飯を食べ、夜にまで及んだこともあった。研一先生はよく問題を整理して考える為に、モデル図を書いてくださる。これを見るとその当時の事を思い出す。考えを形にするのは明確な道筋が頭の中になっていないと描けない。これは私の宝物としてとつてある(図1)。サイエンスはみな平等に意見を言える場である。研一先生、さと先生は私がめっちゃちゃん意見を言っている時でも、きちんと耳を傾けてくださり時間をかけて議論してくださった。この姿勢には本当に感謝している。私もこのようなボスになりたいと思う。

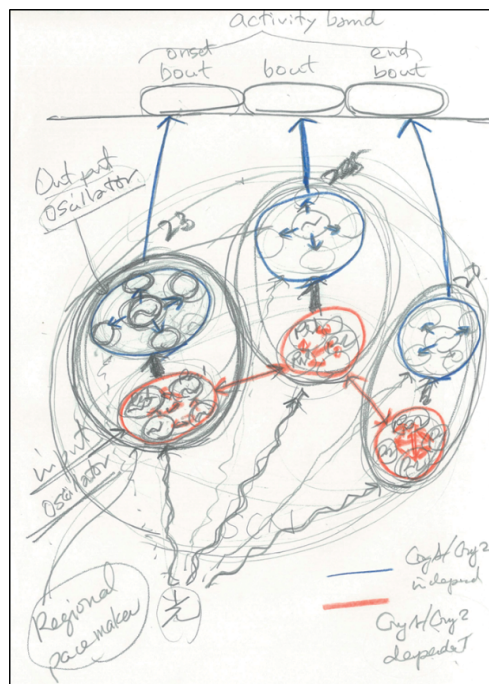


図1：本間研一先生がディスカッションで書いてくださったモデル図の一つ。この図をもとにリズムについての様々な議論を行った。

当時査読者からはかなりの多くのコメントをもらった。それに対して何倍もの議論を重ね研究を進めたことが、私にとって「リズム学」の基本のほとんどを学んでいたことになっていた。特にリズムの概念だけでなく、リズム解析については様々な論文を調べ、多数のリズム解析法を学んだ。少なくともこの時の経験はその後の論文投稿に生きた。またこの時の経験が現在のリズム研究の自信にもつながっている。

論文受理に至るまで

論文を投稿してはrejectを何回も繰り返し、最終的に受理されるまでに3年半かかった。その間様々な実験や解析結果を加え、論文は膨大なデータになっていた[11]。実験開始時は、多電極ディッシュとPer1-lucマウスを用いてCryDKOマウス視交叉上核からの神経発火リズムとPer1発現リズム計測を行っていた。それらのデータをひっさげて2010年のSRBRで発表することにした(図2)。



図2：2010年に開催されたSRBRの夜の飲み会。毎晩夜遅くまで議論が繰り広げられた。左から5番目が筆者。

しかし出発前に衝撃的な事実に出くわす事になる。アブストラクトを眺めていると、「Cellular circadian peacemaking in the SCN of Cryptochrome deficient mice」というタイトルが目飛び込んできたのである。イギリスのHastings博士のグループであった。これを見たとき、半分は“焦り”があったが、半分は“やはり間違っていなかったか”という気持ちだった。CryDKOの視交叉上核にリズムがあることは、実際実験を行った自分ですら信じられない事だったからであり、当事者でない他の研究者にとってはまったく受け入れがたい事であるのは当然である。不運なことにレビュー

ワーとのやり取りをしている間、最終的にHastingsらが先に論文を世の中に出して[12]、私たちは先を越されてしまった。

しかし彼らの論文でも問題は解決されていなかった。CryDKOマウスの行動にはリズムがないにも関わらず、なぜ視交叉上核にはリズムがあるのかという事である。実験系をよく考えてみると一つの可能性が浮かび上がった。それは使われているマウスのageである。スライス培養はこれまで生後まもない新生児を用いる事が多かった。だとしたら、ageを変えて視交叉上核のリズムを計測したら、“ある時期でリズムが消失するのではないか”と考え、私はすぐに実験を行った。生後1, 7, 14, 21日から視交叉上核を取り出し、Lumicycleで発光を計測すると私の予想通りの結果が得られた。この時私は何とも言えない感覚を得た。これを得る為に研究をやっているとんでもないのかもしれない。CryDKOの視交叉上核のリズムは、生後1, 7日あたりまではロバストなリズムがみられるが、生後14日以降は、ダンピングリズムが消失した。1細胞レベルでみると、個々の細胞のリズムの脱同調の結果、全体としてリズムが消失する事を明らかにした [11]。このように私の博士課程は査読者との戦いの毎日であった。1本の論文を出すのにいくつものrejectメールをもらい、精神的にもくじけそうにもなった。研一先生、さと先生の支えがなかったら、どこかの時点であきらめていたと思う。本当に感謝している。

学位取得後

学位取得後は、CryDKOのマウス視交叉上核のリズム消失の分子メカニズムに踏み込んだ研究を報告すると同時に[13]、光ファイバーを用いたin vivo遺伝子発現計測の実験系を立ち上げ論文をまとめる事ができた[14,15]。また視交叉上核からの多機能同時計測系を立ち上げ、発光イメージングだけでなく蛍光イメージングを組み合わせた計測システムを報告した[16,17]。このように北大時代に複数の研究成果を出すことが出来たのは、私が所属していた光バイオイメージング部門や時間医学講座の多くの方々に恵まれていたからだと思う。私は幸せ者である。

これからの方向性

2016年4月からは名古屋大学・環境医学研究所の山中章弘教授の下、概日リズムと睡眠の融合研究をスタートさせた。睡眠・覚醒と概日時計は密接に関わっている事は誰もが否定できないが、この両研究

分野は別学問のように走っており大きな融合は少ないように感じる。概日リズム研究では、輪回し運動や自発運動の時系列データからリズムを計測・解析する一方、睡眠研究では、脳波・筋電図の計測データから、覚醒・REM/NREM睡眠を判定する。つまりお互いに関連があるものの、時間的に異なる別の側面を見ているわけである。私はここ数年をかけて、睡眠・覚醒がいかにして概日時計により制御されているかを明らかにしていきたい。特にこれまで視交叉上核のみを扱ってきたリズム研究者として、視交叉上核のリズムがどのように睡眠覚醒を制御しているかという問いに対する回答を導き出したい。

おわりに

このたびは日本時間生物学会奨励賞という名誉ある賞を受賞することができ、これまで多大なるご指導をしてくださった北海道大学の本間研一教授、本間さと教授に心から感謝いたします。両教授と過ごした時間はとても貴重なものでした。今後は北大で学んだことを私が次世代に伝えていきたいと思えます。私が所属していた、北海道大学の旧第一生理のみなさま、光バイオイメージング部門、時間医学講座のみなさま、その他学外の多くの先生方に感謝申し上げます。最後に、ここまで私を育ててくださった両親と、どんな時もそばにいてくれる妻に感謝いたします。

参考文献

- 1) Pittendrigh C, Daan S: J Comp Physiol 106:223-252 (1976)
- 2) Daan S, Pittendrigh C: J Comp Physiol 106:253-266 (1976)
- 3) Daan S, Pittendrigh C: J Comp Physiol 106:267-290 (1976)
- 4) Pittendrigh C, Daan S: J Comp Physiol 106:291-331 (1976)
- 5) Pittendrigh C, Daan S: J Comp Physiol 106:333-355 (1976)
- 6) van der Horst GTJ *et al.*: Nature 398:627-630 (1999)
- 7) Okamura H *et al.*: Science 286:2531-2534 (1999)
- 8) Albus H *et al.*: Curr Biol 12:1130-1133 (2002)
- 9) Yamaguchi S *et al.*: Science 302:1408-1412 (2003)
- 10) Liu AC *et al.*: Cell 129:605-616 (2007)
- 11) Ono D, Honma S, Honma K: Nat Commun

- 4:1666 (2013)
- 12) Maywood ES, Chesham JE, O'Brien JA, Hastings MH: Proc Natl Acad Sci USA 108:14306-14311 (2011)
- 13) Ono D, Honma S, Honma K: Sci Adv 2:e1600960 (2016)
- 14) Ono D, Honma K, Honma S: Sci Rep 5:12310 (2015)
- 15) Ono D, Honma S, Honma K: Eur J Neurosci 42:3128-3137 (2015)
- 16) Enoki R, Ono D, Kuroda S, Honma S, Honma K: Sci Rep 7:41733 (2017)
- 17) Ono D, Honma S, Nakajima Y, Kuroda S, Enoki R, Honma K: Proc Natl Acad Sci USA 114:E3699-E3708 (2017)