

脊椎動物の光周性と概日リズム研究

池上 啓介[✉]

愛知医科大学 医学部 生理学講座

1. はじめに

この度、第19回(2021年度)日本時間生物学会学術奨励賞(基礎科学部門)を受賞できたことを、大変光栄に存じます。これまでこの分野を牽引してきた過去の受賞者の方々と名前を連ねさせていただけることを大変うれしく栄誉あることと感じます。また同時に、身が引き締まる思いです。これまで4つの研究室に所属し、そこで様々な方の導きがあったおかげで受賞することができました。特に各研究室のPIである小田裕昭先生、吉村崇先生、重吉康史先生、増淵悟先生には心より感謝申し上げます。

本稿執筆にあたり、読者に少しでも感じるものを残すため、これまでの受賞者との違いを比較すると、やはり多くのラボを移動してきたことかもしれない。また、ヒトがあまりやっていないことを研究してきた独自性だろうか?このような視点から、学生などの情報収集などにも役立てられるよう、オブラートに包みつつ笑いは少なめでこれまでの経験や研究内容を紹介することにする。

2. 時間生物学と出会うまで

私は親の影響で中学を陸上競技に勤しんだ。研究生活という静かな厳しい環境における忍耐力や、度重なる夜行性生活にも耐えうる体力等はこの時の礎かもしれない。余談だが、鍛えた筋肉は研究生活でも大活躍し、蓋が空かなくなったメジウム瓶を開けるよう依頼されたことは数知れず、パワー系サンプリングに駆り出され、長時間サンプリングにも耐えうる体をこの筋肉は支えてくれている。現在はその筋肉貯金もだいぶ減り、徹夜サンプリングが翌日に響くようになったのも35歳過ぎくらいからだろうか。

話を元に戻すが、そんな中学生のころに祖父のがん治療の関連で当時ミラクルホルモンとして注目を浴びた著書「奇跡のホルモンメラトニン」(ラッセル・ライター、ジョー・ロビンソン著、服部淳彦監修、小川敏子翻

訳、講談社)に出会った。一応人並みに、子供のころセミヤカエルを解剖したりしてきた身であるが、生物が好きというわけではなかった。ペットを飼うのには抵抗があり、植物も食べて還元できるものしか飼育するつもりがない。逆に言うと食に興味があり、著書に書いてある「飲んで睡眠や時間という生理現象を操る」ことに引かれた。高校で大学を探す頃、食べ物や栄養分野に興味は尽きず、名古屋大学農学部に進学した。入学して分かったことだが、当時の農学部では生物リズムを研究している先生方が多く、小田裕昭先生、水野猛先生、山篠貴史先生、海老原史樹文先生、吉村崇先生がいた。必然とリズムに対する興味が膨らみ、興味ある授業には他の学科の授業も受講し単位認定されなくても勉強していたのを思い出す。4年生からの研究室配属では、食べ物で体内時計を整える時間栄養学を他の指導に紹介する小田先生と研究分野に興味を持ち、小田先生(栄養生化学研究分野)の研究室を希望した。他の学部や大学は知らないが、学部4年からのラボ配属は掛札性で、定員オーバーした際は成績順だった。無事配属が決まったわけだが、学部1-3年で頑張っておいてよかったと感じた。

3. 時間栄養学と概日時計

配属後、時計と関係ない研究テーマも小田先生から示されたが、時計を研究したかった私は迷わず「ラット肝細胞におけるインスリンに対する位相反応を解明」するテーマに飛びついた。細胞の経時的なサンプリングや、糖尿病ラットとの苦闘を経験し、時間生物学研究者は時間が乱れることを初めて学んだ。小田先生や先輩方の指導は非常に丁寧で論理的だった記憶がある。ピケットマンの使い方から、検量線の引き方など基礎からきちんと指導された。また、論文紹介とは別に関連論文を5-10報読み、日本語でまとめて先生に簡単にプレゼンするということをしていた。(学部生にとっては)非常に時間がかかるため小田先生もよく根気よく付き合っていた

✉ ikegami.keisuke.910@mail.aichi-med-u.ac.jp

だいたと今では思う。しかし、このおかげで英語論文を読むスピードは躍進し、理解力も向上したことは間違いない。

研究では肝臓の概日時計が食事によりどのようにリセットされるのかというテーマであった。それまで、肝細胞にも概日リズムがあり、血清刺激でリセットされることは知られていた。さらに食事により肝臓の時計はリセットされることも知られていたが、その同調因子は不明なままであった。そこで食事により上昇するインスリンに着目し、肝細胞の概日リズムに対する位相反応曲線を作成することと、インスリンが分泌できない糖尿病モデルラットを作成し、その肝臓における時計遺伝子の位相の変動を時系列解析した。三日間寝ずにサンプリングし、携帯のバイブレーションで寝ないように QUEEN と ABBA の曲で奮い立たせていたのは良い思い出。はじめてぎっくり腰を経験したのもその時で、徹夜明けの小田先生からの栄養ドリンクの差し入れに「研究いいかも」と思ってしまった私はきっとマゾなのだろう。この研究により、インスリンは肝臓時計に顕著に影響を与えることが分かった¹。追試などにより論文掲載されたのは 2012 年だが、私にとってこの細胞と動物を両方用いて細胞生物学的および生理学的に真理を求める研究スタンスは、現在の基礎となっている。

しかし、肝臓などの末梢時計の研究をしているとどうしても脳からのシグナルとの相互作用などが気になり、脳とホルモンの研究に興味をわいてきた。そこで他学科であったがアクティブな研究をされていた吉村崇先生（動物生理学研究分野）の下で研究したいと考え、4 年の夏に他学科に移る形で大学院受験を決意した。

4. 光周性研究と概日時計

2008 年 4 月、無事合格し大学院に入ってみると、吉村先生は教授になり研究室では甲状腺刺激ホルモン TSH の春告げホルモンとしての役割を発見した Nature が出て大変盛り上がっていた²。光周性は概日時計による日照時間（日長）の測定により制御されていることが古くから現象として知られ、その日長測定機構の解明は光周性の本質である。吉村研では、日長を変えるとウズラの下垂体隆起葉で *TSHB* (*TSHB* サブユニット) 遺伝子発現が増加することを Nature で発表し (図 1)²、ラボとしては脳内光受容器の発見と日長測定の仕組みの解明にシフトしていた。時計の研究に興味があった私は、ウズラとマウスの日長測定の機構の解明に興味を持ち、ラットからウズラとマウスの研究者に可憐に転身した。また、生物種にとらわれない、吉村先生の「現

象の解明には最も適した生物がいる」という視点はこの時の私には非常に斬新に映った。

哺乳類に比べて光や季節の変化に対する生理現象の季節変動が顕著で、特にウズラは長年光周性の研究に用いられてきた。ウズラの日長測定の研究では、鳥類体内に存在する季節の変化を読み取るカレンダーの仕組みには概日時計が関与しており、その機序の解明が重要視されていた。そのためには時計タンパク質の局在と変動の解明が必須であるにもかかわらず、鳥類では良い抗体の作成に誰も成功していなかった。そこで、我々は有用な抗体の作製に成功し、初めてタンパク質レベルでの形態学的生化学的な研究に成功した³。この研究で、これまで遺伝子発現ばかり見ていた私は組織切片の作製からの免疫組織化学や ImageJ macro による細胞カウント、タンパク質発現量の解析など多くの手法を学んだ。1 年足らずで結果を出せたのはその後の自信になり、これが学位論文 1 つ目となった。修士課程の残りでは、まとめるまでには至らなかったが、さらに詳しく解析するためウズラ下垂体隆起葉におけるエピジェネティクス解析なども進めて、いつの日かウェスタンブロットばかりしている日々を過ごしていた。

当時、名古屋大学大学院の生命農学研究科では博士取得にはファースト著者の論文が 3 報必要であった。そこでウズラの時計タンパク質解析と同時に、マウスにおける測時機構の研究を並行で進めていた。脳深部の光受容器で日長を測定するウズラ⁴とは違い、哺乳類では眼が唯一の光受容器であり、概日リズムのペースメーカーである視交叉上核に情報が伝達され、松果体の概日メラトニン合成分泌リズムを制御する (図 1)。そこで、季節の読み取りにおける概日時計の重要性を解明するため、遺伝子改変により検討することが重要であるが、遺伝子改変に適した実験マウスの多くは周年繁殖で顕著な季節性が観られず、哺乳類における季節情報シグナルであるメラトニンを松果体で産生できない。そこで、近年遺伝子発現レベルでは季節応答することが発見されたメラトニン産生できる CBA/N マウス系統を用いて⁵、最も重要な時計遺伝子の一つである *Per2* の変異マウスと掛け合わせ、マイクロサテライトマーカーを用いたメラトニン産生 *Per2* 変異スピードコンジュニックマウスを作出した。修士の間は交配で終わり、遺伝子レベルでの季節変動が起こるかを検証したのは博士課程になってからだった。結果は、変異マウスでも季節応答が観られ、これまでの知見に反して季節反応に必ずしも時計遺伝子 *Per2* は重要ではないことを明らかにし 2013 年によく発表できた⁶。これが博士論文 2 つ目となったわけだが、リバイスが細かく吉村先生の金言「論文を書

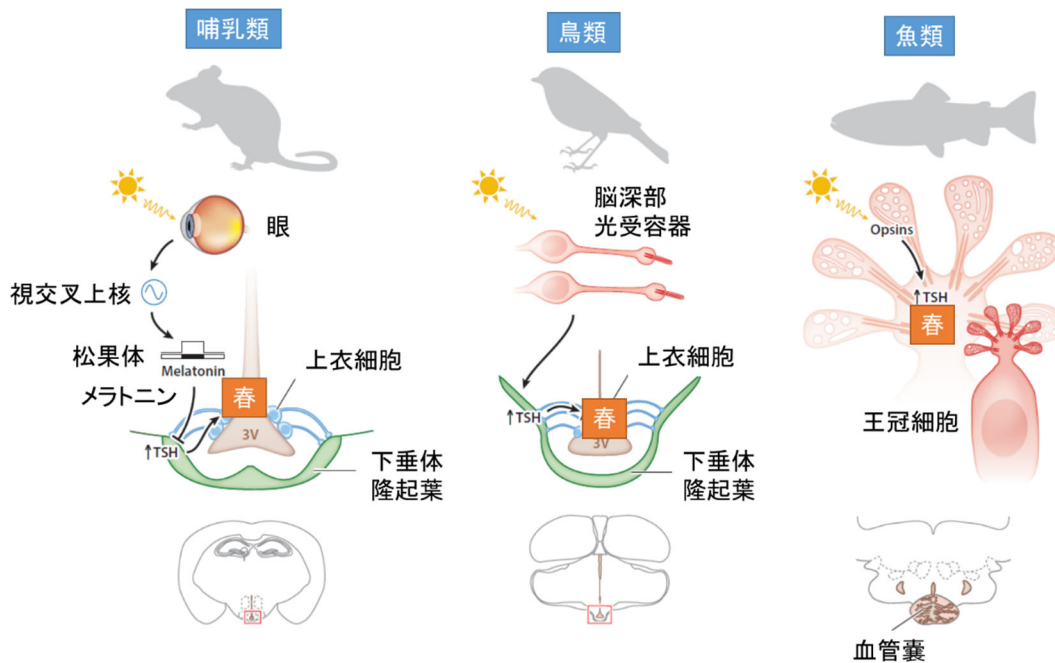


図1 哺乳類、鳥類、魚類における光周性制御機構。参考文献¹³を改変。

くときは魂を注ぐように」を痛感させられた研究でもあった。また、遺伝学的手法はその後の研究でも用いる事になるとはこの時は考えもしなかったが、パワフルさを痛感した研究であった。

5. 魚類の季節カレンダーの発見

そんなころ吉村研では宇都宮大学の飯郷雅之先生との共同研究で魚類の季節を読み取るセンサーの探索を進めていた。哺乳類や鳥類は下垂体の隆起葉に存在するが、魚類は形態学的に確認されておらず季節センサーの局在は長年不明なままであった。博士課程になるころ、先輩の解析したサクラマス(魚類)の遺伝子発現解析で血管囊と呼ばれる部位で *TSHB* が発現していることを発見し、解析してみたらどうも季節変動しているらしいことが分かった。300年前前から魚類特有の器官として存在を確認されていたにもかかわらず、その生理機能が不明であった脳底に位置する脳室周囲器官である。そこで私と同級生で脳内光受容体を研究していた中根右介博士で血管囊における光受容体や *TSHB* および関連因子のタンパク質発現と遺伝子発現を手分けして実施し、血管囊の培養による光応答を検証した。また、吉村先生や後輩たちとともに、外科的手術による生殖器への影響を泊りがけで実施し、1年に1回のタイミングしかないため数年かけて検証した。その結果、血管囊の王冠細胞が、光受容も行い時計遺伝子も発現しており、季節反応のトリガーにもなっている「季節センサー」であること

を初めて発見した(図1)7。出張実験では、何百匹ものサクラマスを手術して数匹生き残る実験の大変さも印象的だったが、その後の夜中にホテルを取りに行く飯郷先生のストイックさは目指すところになり、研究室のすごさには驚嘆した。

6. TSHの精鎖

繁殖や渡り、換毛などの季節応答のトリガーとなるのは下垂体隆起葉で合成分泌される TSH であるが、この隆起葉 TSH は脳内の受容体に結合し季節情報を脳に知らせる。しかし、一般的には下垂体前葉から合成分泌され甲状腺に作用する TSH が知られているが、隆起葉 TSH も末梢血に分泌されているか、されているなら生理的に前葉 TSH と混線しない仕組みは何なのかは全く分かっていなかった。方法で悩んでいると、共同研究者であった甲状腺研究の大家レフェトフ先生(シカゴ大学)の発案で、活性型甲状腺ホルモン T3 慢性投与と日長コントロールの組み合わせる斬新な手法により生理学的に隆起葉 TSH が実際に血中に分泌されることを発見した。この分子生物学が発展する前の巧み手法を駆使して現象を見出す巧みさ鮮やかさに美しさを覚え、アカデミアに残る決意をさせる一因となった。

私は生化学的に隆起葉 TSH は前葉 TSH とは発現制御機構や付加されている糖鎖構造が異なることを発見した。糖鎖解析は一から勉強し質量分析にも身を投じた。学部4年で会得した初代培養肝細胞実験手法を駆使し、

血中における隆起葉 TSH の半減期が異常に長いことを発見した。しかし、隆起葉 TSH の甲状腺への生理活性は組織抽出 TSH では前葉と変わらなかったことから、混線を防ぐ仕組みが説明できず、ここから長いトンネルに入るようになった。悶悶としているころ 1970-80 年代の様々な論文を読み漁り、その中に TSH が血中では血中タンパク質と結合し生理活性を示さない macro-TSH となる論文をいくつも発見した。そこで隆起葉 TSH も血中ではこの形態を帯びているのではないかと考え、興奮して吉村先生に報告し、一緒に盛り上がった。そこで、岐阜大学の岩澤淳先生にクロマトグラフィー精製法の基礎を教してもらい、独自に改良することで隆起葉 TSH のみを含む血中から TSH を分離精製に成功した。それを解析したところ、異なる糖鎖のために血中に分泌されると免疫グロブリンやアルブミンと不可逆的に結合して甲状腺への生理活性を失う、付加糖鎖が生理的な混戦を防ぐ仕組みを初めて発見した⁸。これが博士論文 3 つ目となりやっと必要な 3 つ揃えることができた。なによりも、これらの実験は多くの方々の助けがあってこそ成功したわけだが、困難な問題を自分で乗り越えられたことが研究者人生として大きな糧となっている。悶悶としている間は、上記のサクラマス研究や、ウズラの低温刺激を伴う秋適応の研究にも邁進し、精巣と人生で一番向き合う時期も過ぎた⁹。当初の目的であった中枢と末梢の研究に勤しみ、忙しくかつ多くの糧を得ることができた学生生活であった。

7. 山あり谷ありの近畿生活

幸いなことに、博士 3 年のころ初めての SRBR で出会った重吉康史先生（近畿大学医学部解剖学教室）とのご縁もあり、助教のポストのご提案があった。比較的自由的なテーマで研究ができる魅力のおかげなのか、研究室が変わることにあまり抵抗感がなく、視交叉上核にも興味を持ち始めた私は、育てていただいた吉村先生には不義理を感じつつお話を受けることにした。

近畿大学では、重吉先生のぼけに対する突っ込みやこの受賞論文でも一つは笑いを入れなければ気が済まなくなること以外に、自由にやらせていただけた環境の中で視交叉上核への見識や組織学的アプローチのノウハウを会得することができた。私生活でも親の介護や結婚と子供を授かったことなど浮き沈みがあったが、周りの方の多くのご助力のおかげで何とか「前進」させることができた。肝心の研究では、吉村先生がよく言われていた「教科書に載るような仕事をするように」「科学を前進させる研究をするように」という言葉を痛感させられるものであった。やりたいことに対する研究費およ

び研究環境が行く手を阻み、しばらくの間もがくこととなった。興味ある事にいくつか手を出して模索していた際、ある先生に「やらないことの勇気」が必要であると言われ、頭をたたかれたくらいの衝撃を覚えた。そこで、優先順位や手法を模索し始め、光周性とも関連のあった哺乳類における眼や松果体などの脳室周囲器官を研究したいと思うようになった。埋もれた先行研究に価値を見出した私は、まず松果体の生理機能を概日時計、行動、光感受性といった面から先行研究の矛盾点を 1 つ 1 つ組ほどきながら明らかにする研究を始めた。長年、松果体の機能はメラトニンの機能として研究されてきたが、メラトニン以外の松果体因子の時計への影響や精神への影響など生理機能を明らかにしつつある。

また、近畿大学でも糖鎖着目した共同研究を展開した。シアル酸を糖鎖に修飾する糖転移酵素 *St8sia2* が欠損しているマウスが活動リズム異常や脳室つながりで水頭症発症など様々な表現型が安定していなかったため、遺伝的背景の影響と睨んで、戻し交配を繰り返したところ、*St8sia2* 遺伝子の周辺領域の遺伝子が原因で発生・発達異常を示すことを発見した¹⁰。大学院時代の遺伝学や組織学、生化学的手法が濃縮した研究となった、一方で学生がいないこともあって色々な手法を会得しているがゆえの弊害、他の人を頼れない状況にも陥りつつあった。

上記マウスを戻し交配していたころ、CRISPR/Cas9 法の発見とともに、当大学でも遺伝子改変マウス作成サービスを楽しむようになった。哺乳類において、光シグナルは cAMP 応答配列 (CRE) 結合タンパク質 (CREB) を介して CRE に伝達され、SCN における *Per1* および *Per2* 遺伝子の発現を誘導すると考えられていたが、その CRE が *in vivo* における重要性は不明なままであった。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いてマウスの *Per1/Per2* の既知の CRE を欠損させそれを検証した。結果、驚くべきことに *Per1* 遺伝子光誘導には CRE が機能するが、恒暗条件下のフリーランニング周期や光照射による位相反応曲線には影響を与えず、既知の CRE 以外の CRE 配列の存在の可能性や、それ以外の機構の可能性を示唆するものだった。この近畿大学での時計の仕事は表現型が出なかったこともあり 2020 年にやっと発表できた¹¹。

また、もがいていた理由に近畿大学の 5 年任期があった。次の職の不安がよぎり始める赴任 4 年目の 2016 年夏頃、以前から学会でお話する機会があった現所属の増淵先生（愛知医科大学医学部）から来年ポストが空くからどうだろうかとの有難いご提案があり、それに飛びついた。愛知医科大学は私の出身地である愛知県にあり、

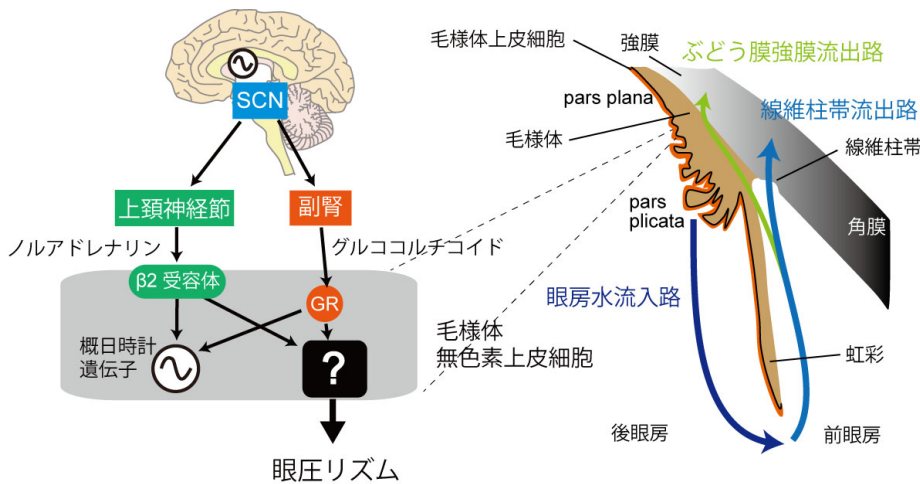


図2 眼球矢状断面における眼房水経路と視交叉上核による上頤神経節ノルアドレナリンと副腎グルココルチコイドを介した眼圧制御経路。

私の親の治療のセカンドオピニオンでも訪れたことがある大学病院であったため、不思議とご縁を感じた。

8. 脳室周囲器官の統合的理解

2018年4月より増淵先生のもとに異動し、研究費を比較的取れたこともあり、近畿大学から始めたかった脳室周囲器官である眼球の概日リズムの制御機構の解明に向けて本格的にスタートした。眼などの脳室周囲器官と脳の相互作用はよく分かっておらず、眼球には様々なリズムが存在し、非常に複雑であり、視覚機能は我々のQOLに直結するため疾患の予防治療は緊結の課題となっている。近畿大学時代から始めていた網膜研究では、哺乳類における唯一の光受容器官である網膜には頑健なリズムが存在し、光により同調されることが知られているが、環境光だけでなくSCNを介して制御される可能性を検証している。

さらに、緑内障の発症原因となる目の硬さ(眼圧)に概日リズムがあるが、そのリズムの乱れが発症の原因となっている可能性が指摘されていた。眼圧は眼房水の産生排出のバランスで生み出されるが、そのリズムの制御機構は詳しく分かっていなかった。他の末梢時計同様、副腎グルココルチコイドと上頤神経節由来交感神経ノルアドレナリンの二つが同調因子の候補であったが、矛盾する報告もあり、それら単独では説明できないでいた。そこで、副腎と上頤神経節両方除去することで打開を試み、マウス眼圧リズムがこれらの2経路により制御されていることを発見した(図2)¹¹。

次に、これら2因子による眼房水産生排出リズムの分子制御機構の解明が残された課題であるが、まず創薬ターゲットの知見が少ない眼房水の排出に着目して概日制御を解き明かすことにした。結果、排出部位の食作用機構が眼房水中のごみを減らして昼間の眼圧低下に関与し、ノルアドレナリンが駆動出力で食作用抑制する

ことで夜間の眼圧上昇を生み出している機構を初めて明らかにした¹²。マウスの眼圧測定は思った以上に過酷で、鍛えた筋肉は役立たず、肘の尺骨神経痛になり、神経を今後は鍛えていくことを秘かに決意させられた。しかし、動物実験、細胞実験、生化学的、薬理的、逆遺伝学的手法などこれまで会得したツールを駆使した研究であり、学生がいない環境で一人で研究を進める上での突破口となる研究となった。

9. おわりに

今後は眼圧リズムの概日制御機構の全容を解明し、緑内障視神経障害との関係解明に向けて邁進し、時間治療に向けた化合物スクリーニングにより創薬基盤研究にも繋げてゆきたいと考えている。また、緑内障は生活習慣の影響を受けやすい疾患であるが、生活パターンや食習慣による患者のQOLの改善や緑内障予防に向けたトランスレーショナルリサーチにも力を注ぎ、松果体研究と合わせて脳室周囲器官の統合的理解を進めたい。今後も時間生物学の面白さに虜になりながら学術分野の発展に貢献していく所存である。

この度の執筆を通じて、これまでいかに多くの方から支援をいただいていたかも再認識させられた。また、これまで私は複数のラボに所属し、研究テーマを変えることもあったが、私はそれを苦痛に感じなかったのは、ひとえに時間軸の概念を考えるのが楽しかったからだどつくづく感じる。過去の埋もれた知見も探索しつつ、既知の知見も尊重し、妄信することなく、リズムという現象をとことん理解していきたい。

最後になりましたが、改めてこれまでご指導いただきました小田裕昭先生、吉村崇先生、重吉康史先生、増淵悟先生をはじめ、多くの先輩方、先生、スタッフに心より感謝申し上げます。私にとってこの時間生物学会がホームグラウンドであり、多くの先輩方や先生方と交流す

る機会に恵まれ、大変多くのことを学び、得ることができました。時間生物学のますますの発展に貢献できるよう全力を尽くしたいと思いますので、今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。また、土日に研究で出かける中、嫌な顔せず近くで支えてくれた妻と、日々の活力になってくれる子供たちに感謝したいと思います。

参考文献

1. Yamajuku, D. *et al.* Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci. Rep.* **2**, 1–10 (2012).
2. Nakao, N. *et al.* Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**, 317–22 (2008).
3. Ikegami, K., Katou, Y., Higashi, K. & Yoshimura, T. Localization of circadian clock protein BMAL1 in the photoperiodic signal transduction machinery in Japanese quail. *J. Comp. Neurol.* **517**, 397–404 (2009).
4. Nakane, Y. *et al.* A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 15264–15268 (2010).
5. Ono, H. *et al.* Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 18238–18242 (2008).
6. Ikegami, K., Iigo, M. & Yoshimura, T. Circadian clock gene *Per2* is not necessary for the photoperiodic response in mice. *PLoS ONE* **8**, 1–12 (2013).
7. Nakane, Y. *et al.* The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nat. Commun.* **4**, 1–7 (2013).
8. Ikegami, K. *et al.* Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Rep.* **9**, 801–809 (2014).
9. Ikegami, K. *et al.* Low temperature-induced circulating triiodothyronine accelerates seasonal testicular regression. *Endocrinology* **156**, 647–659 (2015).
10. Ikegami, K. *et al.* Effect of expression alteration in flanking genes on phenotypes of *St8sia2*-deficient mice. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
11. Ikegami, K. *et al.* cAMP response element induces *Per1* in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **531**, 515–521 (2020).
12. Ikegami, K. & Masubuchi, S. Suppression of trabecular meshwork phagocytosis by norepinephrine is associated with nocturnal increase in intraocular pressure in mice. *Commun. Biol.* in press (2022).
13. Nakane, Y. & Yoshimura, T. Photoperiodic regulation of reproduction in vertebrates. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **7**, 173–194 (2018).