

目次

巻頭言

「逆-時間生理学」	土居 雅夫	64
-----------------	-------	----

お悔やみ

「時間生物学の日本の先駆者—千葉喜彦先生の思い出—」	松本 顕	65
「千葉喜彦先生を偲んで」	富岡 憲治	71
「私のスターナビゲーション—千葉喜彦さんの思い出—」	沼田 英治	75
「追悼—堀忠雄先生」	林 光緒	78
「追悼—堀忠雄先生」	田中 秀樹	80
「堀先生の情熱と人間らしさ」	小川 景子	82
「工藤崇博士を偲んで」	田原 優・中村 孝博・柴田 重信	84

総説

「刺胞動物を用いた概日リズム・睡眠研究」	金谷 啓之・伊藤 太一	87
「時計細胞集団の同期状態に着目した位相応答曲線の効率的な測定方法」	福田 弘和・増田 亘作	94
「位相応答曲線の数理解析」	瓜生 耕一郎	102

特集『視交叉上核発見から 50 年』

「視交叉上核研究今昔」	本間 さと	111
「視交叉上核の謎」	岡村 均	118
「ファブ・ファイブ論文からの視交叉上核研究展開」	中村 渉・高須 奈々・中村 孝博	126

関連学会参加記

「2022 年 EBRS 体験記@チューリッヒ (スイス)」	李 若詩	132
「生物リズムに関する札幌シンポジウム 2022 参加して」	田母神 さくら	134

事務局報告	条 和彦	136
-------------	------	-----

学会会則		140
------------	--	-----

賛助会員リスト		145
---------------	--	-----

執筆要領		146
------------	--	-----

第 29 回日本時間生物学会学術大会 抄録集		148
------------------------------	--	-----

編集後記

日本時間生物学会

理事長 深田 吉孝

副理事長 糸 和彦 吉村 崇 上田 泰己

事務局長	糸 和彦	編集委員長	重吉 康史
国際交流委員長	本間 さと	国際交流副委員長	上田 泰己
評議員推薦委員長	糸 和彦	広報委員長	八木田 和弘
将来計画委員長	岩崎 秀雄	選挙管理委員長	糸 和彦
奨励賞選考委員長	三島 和夫	学術委員長	沼田 英治
連携委員長	上田 泰己	研究倫理委員長	中村 渉
ポスター賞選考委員長	土居 雅夫		

監査委員 廣田 毅

理事

岩崎 秀雄	上田 泰己	糸 和彦	駒田 陽子	佐竹 暁子	重吉 康史
柴田 重信	土居 雅夫	中村 渉	沼田 英治	深田 吉孝	本間 さと
三島 和夫	八木田 和弘	吉村 崇			

編集委員会

明石 真	飯郷 雅之	池上 啓介	伊藤 浩史	岩崎 秀雄	大川 妙子
太田 英伸*	小山 時隆*	糸 和彦	栗山 健一	黒沢 元	駒田 陽子
小柳 悟	重吉 康史	中村 渉	沼野 利佳	肥田 昌子	福田 弘和
増淵 悟	吉川 朋子	吉村 崇	(*副編集委員長)		

(50音順、2022年4月現在)

巻 頭 言

逆-時間生理学

土居 雅夫[✉]

京都大学大学院 薬学研究科

逆遺伝学や逆薬理学が表現する学問の体系になぞらえて「逆-時間生理学」という見方を表現してみたい。

順遺伝学では、得られた表現型の形成に至る未知の遺伝的背景に迫る一方、逆遺伝学では狙った既知の遺伝子を改変してその未知の表現型に迫る。Tau ハムスターなどに代表される特有の形質を示す生物ラインの取得を前提とする前者に比べ、ゲノム情報で開かれた2万個以上の遺伝子群が対象となる後者は、全世界の研究者に研究の新たなチャンスを一斉に与えた（与え続けている）という点で大きい。小生もその時代性に生きている。

薬理学は、薬の作用のことわり（理）を明らかにする学問である。古典的な薬理学では、作用メカニズムは分からないがなぜか生理活性をもつ物質（つまり人類の経験知から得られた薬）があり、その生体での作用点（未知の受容体）を明らかにしようとする。一方、逆薬理学では、ゲノム情報で明らかにされた有力な作用点候補（つまり受容体や酵素の形をした蛋白質）に作用する薬のたねを探す逆向きの方法がとられる。昔に比べ、作用点の分からない生理活性物質などもうほとんど残っていない中、逆薬理学は、全ての研究者に新薬創出の希望とチャンスを与える学理であり、小生も薬学にたずさわるものとして、その希望の中に生きている。

何が既知で何が未知なのか、表現型なのか遺伝子なのか、リガンドなのか受容体なのかを整理することで、分野が内包する順・逆の方向性が見えてくる。そして、現時点で、「表現型」のレパートリーよりも機能が unannotated の「遺伝子」の方が多くことや、known の「生理活性物質」よりもゲノムにコードされた「受容体」の方が多くことから、私たち世代に残された一般的な課題の向きも見えてくるのが面白い。

生体リズムは、全身の数十兆個もの細胞で生まれ、脳の中核時計 SCN によって全身のリズムの調和がとられる。時計システムは組織、個体に張り巡らされ、全ての階層で時が刻まれる。生理機能の多くがこの体内時計に影響されるのは明白である。実際、この十余年の研究成果の堆積によって、生理学の教科書に載っているほぼ全ての重要な生理現象には体内時計からの制御が入力することが示されたといつて過言ではない。

「既知」の生理機構に体内時計からの寄与をあてはめてゆく研究体系を、順-時間生理学と名付けるのであれば、この現在飽和しつつある方法の逆にあたる（あるいは補完する方法にあたる）逆-時間生理学がこれからの研究課題の1つになるのではなかろうか。

現在入手可能な生理機構の分子機序そのものが実はそもそも不完全だ。体内時計が支配する生理的素過程は広範で、mRNA の発現はもとより、転写後制御、翻訳後制御、メタボライト・イオン制御、オルガネラ機能制御、細胞形態変化制御、細胞内シグナル伝達、細胞間シグナル伝達、脳神経回路制御、臓器を跨ぐ液性神経性シグナル制御、エクソソーム、マイクロバリオーム制御に亘る。既存の GO や KEGG pathway の記載は不完全であり、本当の現実の生理機構は未知の pathway で満ちている。オーファン「遺伝子」が known の「生理機構」よりも圧倒的に数が多い。このような局面ではたとえ体内時計に制御される X を見出してもたちゆかない。X を起点に未知の生理機構の解明に進む逆-時間生理学的アプローチが必須となる。

もちろん未知の機構の解明は一筋縄ではいかない。X を中心としたつぶさな解析が不可欠である。しかし X の活性の日内変動が他の P や Q よりも明らかに強靱で安定ならば X の活性には重要な意味があるに違いない。体内時計は細胞内・組織・臓器間のどの層においても重要な nodal point を制御しているはずだからだ。

こうした体内時計屋ならではの特異な視点が、他の分野にはない優れた「目利き」となり、新機構を切り拓く「ブッシュナイフ」になると私は信じている。体内時計を起点にしたからこそ例えば未知のドライアイ機構が見えることもある— 逆-時間生理学のネーミングの良否は別にして、これから先の十年、体内時計と未知の生理機構をつなぐ研究が大きな成果とともに発展していくことを期待したいと思う。

✉ doimasao@pharm.kyoto-u.ac.jp

時間生物学の日本の先駆者—千葉喜彦先生の思い出—

松本 顕[✉]

順天堂大学医学部

恩師 千葉喜彦先生のご逝去を悼み、謹んでご冥福をお祈りいたします。

私は、山口大学理学部での修士課程在学中、および、その後は研究室の教務員として千葉喜彦先生の元で過ごさせていただきました。大学院に入学した 1988 年 4 月から、千葉先生が退職される 1 年前までの合計 6 年間になります。ちょうど千葉先生が学内外の重職を担われて一層お忙しくなった時期と重なったこともあり、研究以外の面でも多くの薫陶を頂く濃密な時間を過ごさせて頂けたと思います。

しかしながら、本稿を読まれている特に若い学会員のみなさんの中には千葉喜彦先生といってもびんと来ない方も多いと思います。そこで、千葉先生ご本人からお聞きした記憶を元に、千葉先生の御経歴をたどりながら、先生が目指されてきたことなどを紹介させていただこうと思います。私の記憶違いや誤解、いまとなっては確認しようがない事柄も多々あることを御承知の上でお読みいただければと思います。追悼文としては異例に長く、引用リストもつけていませんが、ご容赦ください。

たとえ少々不正確であったとしても、この機会に日本の時間生物学の黎明期の様子をなるべく詳しく若い学会員のみなさんにお伝えできれば、本学会の初代会長でもある千葉先生に喜んでいただけるだろうと思って執筆しました（あとでも書きますが、千葉先生は「ふふん、そんなもの。おい、松本。頑張りすぎだぞ」と皮肉っぽく笑われると思いますが）。

なお、登場する先生方の御所属などは私にわかる範囲での「そのエピソード時点」での、あるいは「千葉先生から話をお聞きした当時」のもので、また、いまでは故人となられた先生もいらっしゃいますが明記しておりません。

【ご出身から高校まで】 千葉先生は 1931 年（昭和 6 年）のお生まれですから太平洋戦争前で、ご出身は日本統治下にあった平壤と伺いました。千葉先生は引退後に画家としてもご活躍でしたが、「絵が好きなのは母親の影響かもしれんな」とおっしゃっていたのを覚えています。また私の親が小学校の教員であったこととお話しした時に「自分もだ」ともお聞きしました。しかし、お父様のお話は一度もお聞きしたことがありませんので、ひよっとするとお母様が小学校の教員をされていたのかもしれない。単なる私の想像ですが。

旧制中学時代に終戦を迎えてご家族で仙台に引き揚げて来られ、その後、仙台二高に通われました。子供時代から野球少年だったそうで、高校でも野球部だったそうです。

そういえば、私が大学院在学中に毎年開催されていた研究室対抗ソフトボール大会ではピンチヒッターとしてバッターボックスに立たれることも時々ありました。当時の学生たちの一致した千葉先生の印象は『頑固で威厳がある（つまり、ちょっと怖い）いわゆる昔ながらの教授らしい教授』でした。相手研究室のピッチャーの学生にとってははかなりのプレッシャーだったと思います。自然と投げ込む球も緩くなりがちでした。なお、千葉先生は打撃専門で、バットを振った後の 1 塁までの全力疾走は学生の役目でした。

【加藤陸奥雄先生の門下へ】 大学は東北大理学部に進学され、生態学の加藤陸奥雄教授の門下に入られました。クラスメイトには、東北大教養部の菊地俊英先生（ショウジョウバエの味覚嗅覚研究の先駆者。九大の谷村禎一先生の恩師で、谷村先生が大学院生の時に急逝）、筑波大の柳澤嘉一郎先生（細胞性粘菌の研究者。一世を風靡した文筆家で研究者の柳澤桂子さんの夫人）がいらっしゃり、「三羽鳥と呼ばれていた」そうです。このお話は、お正月に千葉先生のご自宅にお招き頂いた際（毎年ではないものの恒例行事でした）、

千葉先生の奥様からお聞きしました。

奥様に続いて千葉先生は「3人とも行動に関連した研究を目指したけれど、思えば、自分(千葉先生)が出身研究室の路線を最後まで引継ぐことになったな」と振り返られていました。これは、加藤教授の元で助手・助教授を歴任されたことを踏まえての回顧と思います。

加藤先生について千葉先生から詳しくお聞きしたことはありませんが、京大名誉教授 森主一先生は、1960年のコールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム(本格的な時間生物学の幕開けとなった集会)を振り返られた日本時間生物学会誌 Vol.3 No.1 (1997)の巻頭言で『当時日本で生物の周期活動を研究していたのは、後に東北大学学長を務められた故加藤陸奥雄氏が、イナゴハナゾウムシという昆虫の日周期活動と日射・体温との関係を研究していたのが、私の記憶に残る唯一の人である』と記されています。

【多様性を重んじる研究スタイル】 加藤先生の元、千葉先生は日本でもかなり早くから時間生物学研究を開始されたおひとりでした。学生時代から一貫してご自身の専門とされてきたのは蚊の生態学/行動学でしたが、種にとらわれず、常に時間生物学の分野全般に目を配られていたように思います。千葉先生のバックグラウンドは生態学だけに、現在リバイバル中の“生物の多様性”に着目した研究スタイルの先駆けといえるかもしれません。千葉研究室で提示される卒論テーマに関してもこの方針は貫かれており、私がいた6年間だけでも、ハエ、蚊、コオロギだけでなく、プラナリア、ブラインド・ケープフィッシュ、シコクメクラヨコエビなどを研究対象にしている卒研生たちがいました。

さらに、千葉先生の研究指導スタイルの特徴のひとつとして、リズムの観察方法の模索や活動記録装置の開発から着手させていたことが挙げられるかと思えます。さまざまな生物の中には、概日時計を持っているか否か判らず、また、どの現象や行動に着目すれば明瞭な概日リズムを観察可能か判明していないものもあります。その生物に合わせたモニター方法を探するのは当然と言えば当然ですが、モデル生物一辺倒の最近の時間生物学の研究室ではあまり見かけなくなったスタイルのような気がしています。ショウジョウバエを扱っている私が指摘するのは、おこがましい限りですが。

そもそも千葉先生若かりし頃は、赤外線遮断型のアクトグラフや、高感度の生物発光撮影装置など全く無

い時代です。昆虫の羽音の長時間録音や、はばたきによる風圧変化を感知するいわば極小の手作り地震計でのリズムモニターなど、観察対象の生物やその行動特性に合わせていろいろな活動記録装置の開発に挑戦し、そして「まあ大体は失敗だったな」とも伺いました。失敗続きでイヤになってしまったのかもしれませんが(冗談です。本当はお忙しくて時間がとれなかったのだと思いますが)、私がいた頃は、千葉先生はテーマを与えた後は装置の開発や指導などの細々ごとには直接かかわらず、当時助手だった富岡憲治先生(現・岡山大)が学生たちの日々の指導を一手に担う体制でした。

【理想とする研究環境】 海外留学の1回目は1969年から1970年にかけてミネソタ大学のハーバーク教授の研究室に行かれたそうです。しかし、残念ながら私はこの時の逸話をお聞きした記憶がありません(ハーバークについては、千葉先生の講義で「サーカディアンという用語を作った人」とお聞きしましたが)。唯一の例外は「アメリカではデータ収集に関するオートメーション化がかなり進んでいて、強い衝撃を受けた」という感想のみです。この衝撃が千葉先生にとって本当に強いものだったことは、次のエピソードからも伺えます。

私は大学院生の頃に千葉先生の“理想とする研究環境”についてお尋ねしたことがあります。千葉先生曰く「いったん実験をセットしたら、あとは自分の机の上のパソコンで生物の活動状況もインキュベータの温度や照度も、全ての情報が一目でわかる。そういう研究環境をここ(山口大学)に作るのが、夢といえば夢かもしれない」。

いまや当たり前の研究環境に聞こえますが、私がお話をうかがった1980年代後半は、やっと16ビットパソコンが普及し始めた頃。Windowsの最初期バージョンもまだ存在せず、20MB(テラでもギガでもなく、メガです)のハードディスクが“大容量記憶装置”と呼ばれた時代であることを踏まえると、千葉先生のお答えに対する印象も変わってくるのではないのでしょうか。

【CARPs (Circadian Activity Recording System)】

実は、千葉先生の積年の夢は、私が上記の質問をした1988年にはすでに部分的に実現されつつありました。私の2年先輩で電子工作とプログラミングにめっぽう強い正木忠勝さん(現・沖縄高専)と、富岡先生のご活躍によるものです。8ビットマイコンを利用して

128 匹の概日活動を連続自動モニターし、手製の伝送ケーブルでそのデータを 16 ビットパソコンに送ってさまざまな解析を行うシステムが作り上げられていたのです。まだプロトタイプでしたが、小規模なインターネット環境を手作りで研究室内に張り巡らしたイメージでしょうか。

このシステムは数年後には 4 台（合計 512 個体の同時モニター）にまで増設され、実験室と学生部屋の天井や床は配線だらけの状況になって行きました。ご承知のように、時間生物学の研究にはどんな形であれ概日リズムのモニターが必須です。そういった意味で、千葉研究室の CARPs（P は広島出身の正木先輩がお気に入りの球団名に因んで無理に入れ込んだというウワサでした）は当時の最先端で、他大学の先生方が見学にもえることもありました。私が明瞭に覚えているのは、奈良女子大の大石正先生が学生さんと来られたことです。また、私の行ったショウジョウバエの時計変異体スクリーニングも、このシステムがあつてこそ成立したと言えます。まさに、千葉先生の夢を富岡先生が具現化した成果の上に、タイミングよく乗っからせて頂いた感じです。

【蚊の脳手術】 千葉先生の 2 回目の留学は 1980 年、ジョージア大学のレー教授の元への 2 ヶ月間の短期留学でした。蚊の脳の手術方法を学ぶという明確な目的をもって臨まれたようです。この時のエピソードに関しては、千葉先生の御著書「生物と時間 ジョージア大学だより」（東海大学出版会）に詳しいので、図書館の書庫などで見つけてお読みくださればと思います。

扱いなれた蚊を用いて、概日時計の脳内での所在を外科的手術で確かめる計画への第一歩としての留学でした。実験の概要としては、麻酔した蚊の頭部を開いて生かしたまま脳の一部を切除し、その後、手術した蚊の活動リズムを 1～2 週間計測。どこを切れば飛翔活動の概日リズムが無くなるかで時計細胞の位置を確認する、というものです。

留学の成果は 1987 年の論文に結実します（Kasai & Chiba, *Physiol Entomol*, 1987）。院生の笠井聖仙さん（現・鹿児島大）がもっぱら手術を担当されたようですが、「せっかく脳の一部を切除し終わった蚊が麻酔から醒めて飛び立ち、みんなで慌てて追いかけた」（＝それだけダメージ少なく蚊の脳手術を行った）という伝説が、私たち学生の間には伝わっていました。

笠井さんが手術の時に使用したのかは不明ですが、千葉先生が留学時に使われていた、細く研いだメスの

刃を指貫に装着した手製の手術器具の実物を見せて頂いたことがあります。あまりに細かい手術のため「メスとピンセットは大きすぎて使えないので自作した」とのことでした。指貫を人差し指の先につけ、爪先で引掻くような感じで手術を行ったそうです。留学当時のことや蚊の脳手術のコツなど、ひとしきり熱心に思い出話をされた後、「どうせ松本は『ハエなら、そんな脳形成変異体を使えば一発ですよ。それより PER の抗体染色で充分』とか言うんだろ」と皮肉を言って独特のニヤツとした表情をされたことを思い出します。

千葉先生は大変な照れ屋で、また、物静かで斜に構えた「いかにも学者風な」雰囲気醸すことに強いこだわりのある、良い意味でも悪い意味でも”気取り屋”のところがありました。熱心に話したり大喜びしたりしている時にふと我に返って、突然、照れ隠しに変な皮肉を言って話をやめてしまうこともしばしば。当時は私も若くて戸惑ったりカチンと来たりもしたのですが、もうそんな皮肉も聞けないと思うと少し寂しく感じます。

【交尾によるメス蚊のリズム変調】 千葉先生が退職前の数年間、最も力を入れて取り組まれたのは、交尾によってアカイエカのメスに生じる活動時間帯の変化に関する研究です。

蚊の活動はオスもメスも交尾前は薄明薄暮型の二峰性ですが、メスの蚊は交尾後に夜行性に變化します。交尾したメスの蚊は卵成熟の栄養補給のために吸血を行います。吸血するのは深夜。獲物が寝静まり、闇に紛れての接近も容易な時刻です。つまり、夜行性への変化はきわめて適応的な行動変化といえます。吸血・産卵を終えたメスは、やがて二峰性の活動型に戻ってオスの作る蚊柱内で再交尾します。蚊柱が立つのは深夜ではなく昼下がり～夕方なので、オスの活動タイミングに一致した二峰性の活動パターンへの復帰も非常に理に適った変化といえます。

まさに、概日リズムの生態学的意義にも深く関連した現象で、千葉先生はこのメカニズム解明に研究人生の集大成として取り組まれました。生化学的手法とバイオアッセイを駆使して、オスの生殖付属腺で作られ、精子と共にメスに渡される物質が行動変化のカギであること、その物質はおそらくペプチドであること、そして、メスの脳に直接到達して作用するのではないかとまでは推測できる程度に解明は進んだものの、残念ながら物質同定や作用機序の解明には到らないままに時間切れになってしまいました。

退職からしばらくたってお話しした時には、いつものように少し斜に構えて「人生そんなもんだよ」「自分（千葉先生。あるいは研究者全般かも？）に興味のある研究が上手く行こうが途中だろうが大したことではないぞ」とおっしゃっていましたが、きっと悔しい思いをされたと思い、私としては少し申し訳ない気分になりました（これについては、本稿の最後で再びふれます）。

このテーマに着手された1980年台といえば、まだ時計遺伝子の存在すら（日本国内では）疑われ、分子生物学/生化学的な手法も現代とは比較にならないほど貧弱でした。オスからメスに交尾で伝わり、メスの脳に作用して、活動リズムを適応的に変化させる（オス由来の）物質。バイオアッセイなどが大変すぎて研究室に手勢を持たぬ今の私が引き継ぐことは難しいテーマですが、いま取り組んでも一流誌を狙えるほど斬新なものと感じます。

【文筆を通じた啓蒙活動】 時代は前後しますが、千葉先生のお名前が研究者の間だけでなく世の中に知れ渡ったのは、1975年の「生物時計の話」（中央公論社 自然選書）の毎日出版文化賞受賞がきっかけです。千葉先生ご本人は例のごとく「生物時計」という言葉は広まったな。自分（千葉喜彦）の名前についてはどうだかな」とおっしゃっていましたが、この書籍は、生物種ごとにそれまでの時間生物学的研究の成果をかいつまんでまとめた一般向けの科学啓蒙書ですが、いま私が読み返しても大変に面白く読めます。

千葉先生は非常に人物評価に慎重で（ひらたく言うと、とても厳しい先生で）、めったに他人を誉めず、ご自分の自慢話も一切されませんでした。「自分でも驚くほど話題になりましたね。TV局から取材電話まで来て驚きました」ともおっしゃっていたので、よほどの反響があったのでしょう。

千葉先生は、多くの教科書や専門書の他に「蚊も時計を持っている」（さえら書房）という子供向けの解説書も出版されています。おそらく、日本の未来を担う小さい子供たちに「科学する心をもってほしい」「生物時計のことを知ってほしい」と考えられてのことと思います。ちなみに、この本は子供対象で挿絵の多い本ですが、決して「絵本」と言わないでください。私は「絵本」と言って、千葉先生から「あれは絵本ではない。やさしく書いてあるだけで、れっきとした科学啓蒙書だ！」と、こっぴどく叱られたことがあります。

【岩波「生物時計」執筆と学会活動】 「生物時計の話」の執筆依頼は、その前年に脱稿した「生物時計」（岩波現代科学選書）がきっかけと伺いました。この書籍は発刊から長らく、生物時計に興味のある研究者の間で”標準教科書”とも言われていました。特に、当時の日本人著者によるものとしては異例といえるほど充実した引用文献リストが特徴のひとつです。執筆前から書き溜めて活用されていた書誌検索カード（分類ごとのパンチ穴をあけて論文名や著者名、雑誌名を手書きした厚紙のカード）の箱が、教授室にうず高く積み上げられていたのを思い出します。

私は千葉先生に「生物時計」執筆の動機をお尋ねしたことがありますが、千葉先生のお答えは大変に意外なものでした。曰く「当時は暇だったからね」。山口大学文理学部に赴任された当初は、研究室所属の学生がほとんどおらず、「ならば」と一念発起して、それまでの知見をまとめ始めたとお聞きしました。

繰り返しになりますが、千葉先生は大変に照れ屋だったので、この時も本心をおっしゃらなかっただけで、本当は「時間生物学（の素晴らしさや研究の緻密性）を世に知らしめる」という大きな目標をもっての執筆だったと私は確信しています。そして、千葉先生の意図は見事に実現したと。

以下は千葉先生以外の複数の先生から伺った話ですが、岩波「生物時計」と「生物時計の話」出版以前は、動物生理学の分野内ですら「生物時計など嘘っぱち」「生物リズム研究などバカのやること」（＝研究レベルが低すぎる）という批判が、少なくとも一部には色濃くあったのだそうです。「千葉先生の出版によって、むしろ専門家が社会から後押しされる形で認識を改めることになって行った」ともお聞きしました。もちろん“徐々に”ではあったようですが。

これと関係しているかは不明ですが、千葉先生ご自身も「動物学会には世話になっているけれど、同志とよべる人が多いのは昔から生気象学会の方でね。でも、理学系の若い人が来るような学会ではなかったから、どうしても生物リズム研究会が必要だったんです」とおっしゃっていました。少し補足すると、千葉研究室内の大学院生は日本動物学会の支部大会や本大会で学会デビューするのが慣例でした。また、千葉先生は1987年に動物学会賞を受賞されています。生物リズム研究会は1984年に設立され、10年後の1994年に臨床時間生物学研究会と合流して日本時間生物学会になりました。その初代会長の重責を担われたのが千葉先生です。

【常に分野の発展を願う】 千葉先生が山口大学で主宰されていた研究室、つまり私の出身研究室の大学院での名称は「環境生物学講座 時間生物学研究室」であったと記憶しています。当時、“時間生物学”の名称を冠する研究室はまだ非常に珍しかったはずで、千葉先生の強い思いが覗えますが、それだけでなく環境生物学講座のスタッフ集めにも千葉先生の時間生物学への思いが込められていることを、私は修士課程を修了する頃に知りました。それは、千葉先生から「教務員として雇うので、いましばらく山口大に留まれ」というお話を頂いた時です。当時の山口大理学部には博士課程はありませんでした。

「時間生物学は学際的な学問ですから、研究方法も研究視点も多様でないとダメです。でも、アメリカと違って日本では各分野の専門家をポスドクで呼ぶなんてできません。そこで、です」。ちなみに、当時はポスドク制度自体が日本にはありませんでした。

「(文理学部から理学部に改組した 1978 年に) 研究室を立ち上げるにあたって、私(千葉先生)は生態学の専門家なので、助教授には内分泌の遠藤(克彦)さんに、助手には神経生理の富岡(憲治)くんに来てもらいました。これからの時代で足りないのは遺伝子の分野です。今後必ず、行動や生態学も遺伝子を使った解析が主流になります。だから、松本を教務員で残せるように動いたんです」。遠藤克彦先生は名大の福田宗一先生(前胸腺ホルモンの発見者)の研究室ご出身で、蝶の季節型ホルモン(=光周性)の専門家でした。富岡先生については本学会では説明の必要などないでしょう。

前述の通り、当時、千葉先生は退職を数年後にひかえて、研究人生の集大成として交尾に伴う蚊の概日活動変調の解明を目指されていました。「私(松本)ではそのテーマへの貢献は難しいのに、なぜその方面での人材強化を優先しないのか」という私の質問に対し、千葉先生はきっぱりとこう答えられました。「いまさら千葉の小型を作ったってどうなる。そんな考えでは(時間生物学)分野の発展など覚束んだらう」。これを踏まえて、「自分に興味のある研究が上手く行こうが途中だろうが(もっと重要な目標に比べれば)大したことではないぞ」発言を思い出していただくと、千葉先生がご自身の研究成果よりも時間生物学分野の発展の方をいかに重視されていたか、よく御理解いただけると思います。

【分野の重鎮として】 千葉先生は、時間生物学分野の当時の若手～中堅研究者のことも常に気にかけて

いらっしやいました。ときには分野や若手の行く末を案じるあまり、さすがの千葉先生でも自ら課した重圧におしつぶされそうになることも御有りだったのかも知れません。

学会帰りの新幹線の中で千葉先生が半分独り言のようにつぶやかれたことがあります。いつも比較的小声でゆっくり話される先生でしたが、本当に小さくてしぼりだすような声でした。「(自分=千葉先生に)もっと力があれば、大きい科研を起こして彼らに活躍して貰うだけどね」。経緯は全くわかりませんが、めったにない弱気発言でした。「才能もあって頑張っているのに報われてない若手が潰れてしまうようでは(時間生物学)分野の行く末は真っ暗です。なんとかしてあげたいとは思うがね……」。

しばしば富岡先生と私は「よその心配をする前に、こっちの心配をしてくれよ」と愚痴りあったものですが、ある程度の年齢になってはじめて千葉先生の心情も理解できるようになりました。

【引退後は画家として活躍】 千葉先生は 1995 年 3 月に山口大学を退職され、1998 年には本学会の学会長の任も終えられました。退職後はご自宅にアトリエを構え、絵画や文筆といった創作活動に力を注がれる日々であったと聞き及んでいます。展覧会で入選なども果たされています。

千葉先生の時間生物学分野への信念は、「生物時計なんか嘘っぱち」の迷信を打破し、「時計専門の遺伝子なんてあるわけがない」の蒙昧を乗り越え、現在の日本時間生物学会の隆盛へとつながる道を拓きました。そして、途中でも書きましたが、千葉先生の研究スタイルの特徴である“生物の多様性”や“概日リズムの生態学的意義”への着目も、いままた時間生物学分野の中でリバイバルされつつあります。

2017 年の時計遺伝子研究に対するノーベル賞に関連して、私の著作「時をあやつる遺伝子」(岩波科学ライブラリー 275)の献本をお送りすると、ご自分が描かれた絵葉書と達筆な御礼状を頂きました。2018 年の夏でした。泊りがけで学会などに出かけられた時には、早起きしてホテルの窓辺から見える風景を白紙のハガキや小さなスケッチブックなどに描かれるのが在職中からの習慣でした。「松本から暑中見舞いや年賀状を貰うと、せっかく描いた絵葉書で返信しなくてはいけないからやめてくれ」と言われていましたので(独特のお気遣いの言葉と思います)、これが千葉先生から頂いた初めての絵葉書になります。写真も「あまり好きじゃないんだよね」とのこと

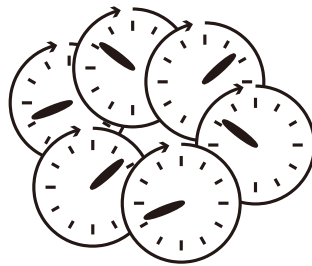
で、千葉先生とのものは今回探しても出てきませんでした。

千葉先生の最晩年は、長年住まれていた山口のご自宅から、お嬢様のお住いの近くの施設に引っ越され、部屋を2つ借りて一方は絵のアトリエにされていたとのことでした。

きっと時間生物学分野の発展に納得・安心されなが

ら、好きな絵を描いて静かな時をすごされていたのだらうと思います。最後は老衰であったとお聞きしました。享年 90 歳。

あらためて、千葉喜彦先生の慧眼と時間生物学分野への先駆的貢献に心から敬服、感謝しつつ、ご冥福をお祈りする次第です。



千葉喜彦先生を偲んで

富岡 憲治[✉]

岡山大学名誉教授

2022年2月に千葉喜彦先生がお亡くなりになった。もはやお会いすることができないと思うと、とても寂しく、残念でならない。

千葉先生は、1931年12月1日に朝鮮の平壤でお生まれになり、帰国後は宮城県仙台で若き日を過ごされた。高校卒業後、東北大学理学部に進学され、加藤睦奥雄先生に師事して蚊の行動の生態学的研究を進められ、「Experimental study on the activity of the mosquito」により1967年に理学博士を授与された。我が国の時間生物学の創成期を担われた先生は、このころに開始された蚊の活動の概日リズムの研究を生涯にわたって進められた。平壤のお生まれであることは何度かお聞きし、その時生物リズムの研究者の中にも朝鮮から帰国された方があると言っておられた。当時（1980年ころ）九州大学でSCNスライスを使って、柴田重信先生とともに単一ニューロンの電気生理学的研究を進めておられた大村裕先生もその一人とお聞きした覚えがある。

東北大学で助手として勤務されたのち、1970年に山口大学文理学部に助教授として赴任され、その後1978年に教授に昇任された。赴任当時の話として、当時は珍しかったオートマチック車に乗っておられたそうで、しばしば「どこかお身体に悪いところがあるのですか」などと聞かれたそう。お若いころにはバトミントンで国体に出場されるほどのスポーツマンで、至ってお元気だったそうなのだが。山口大学赴任後には、蚊の体内時計の研究を進める傍ら、秋吉台の洞窟に棲息する生物にも興味を惹かれたようで、当時の学生たちに、半洞窟性のカマドウマやオオゲジなどのリズムについて卒業研究を指導されている。山口市はフランシスコ・ザビエルがキリスト教を最初に布教した地として有名であり、その布教400年を記念するカトリックのザビエル記念聖堂が町の中心部にある亀山という小高い丘の上に建てられていた。この聖堂はザビエルの生家のハビエル城を模って建てら

れたもので、鐘楼からは心に染み入る鐘の音が風に乗って響いてきたものである。残念ながらこの聖堂は落雷による火事で1991年に焼失し、今はモダンなヨーロッパ風の建物に代わってしまった。話がそれだが、ザビエルは布教時に、当時山口の領主であった大内義隆に機械時計を献上している。これが我が国に初めて渡来した機械時計とのことである。千葉先生は、このことを引き合いに、山口で時間生物学を研究することの不思議な巡り合わせをしばしば口にしておられた。

山口大学文理学部は、1978年に人文学部と理学部に改組され、理学部生物科学科が誕生した。その教授となられた千葉先生は、新設された環境生物学講座を主催された。新たな講座を造るにあたって、助教授には名古屋大学理学部から昆虫の内分生物学を専門とする遠藤克彦氏を、助手には岡山大学大学院理学研究科修士課程を修了したばかりで昆虫の神経生理学を専門とする私を採用された。ご自身の専門が生態学であったので、専門分野の異なる教員で講座を組織し、多角的なアプローチにより当時謎に包まれていた概日時計の実体を解明しようと意欲満々であられた。研究室は3階建ての旧文理学部南棟の2階東側4部屋とさらにその東側に新たに増築された3階建ての2階にあった。私は遠藤助教授とその一番東側の南向きの部屋を共同で使った。まだ新築の建物独特の臭いのする部屋で、私の机が置かれた東側の壁は、夏になると太陽に直接曝され、熱気が直に伝わってきた。まだエアコンは無く、汗を拭きながら作業をしたことを思い出す。千葉先生の教授室は、私たちの部屋とは大きな実験室を挟んで西側にあったが、壁側のドアを通りその実験室を通して直接行くことができた。実験結果をお見せしに行くと、改組や大学院設置の準備に追われ忙しくされていた先生は、何時もにこやかに「こうやって研究の話をするのが一番楽しいよ」と言われたことを思い出す。

その当時、文部省の補助金による非常に大きなプロジェクトである特定研究「動物行動の発現機構」が始まったばかりで、その研究費から多額の支援を頂いて、私の電気生理実験機器のセットアップをしていただいた。それによって、コオロギ複眼の ERG リズムや、視葉の電気活動のリズムなどの研究を進めることができるようになった。千葉先生には、時間生物学分野での論文の書き方も含めて、私の 40 年にわたる時間生物学研究の始動をご支援いただいたことに、言い尽くしがたい感謝の思いを抱いている。様々な研究会や班会議などに同伴させていただ

き、多くの先生方と知り合う機会も与えていただいた。本間研一先生と初めてお会いしたのも、横浜市立大学の江口英輔先生のお世話で横浜で開催されたこの特定研究の「リズムと動機付け」班の会議のときだった。班長は京都大・霊長類研究所の久保田競先生だった。久保田先生は日頃からランニングがお好きで、佐賀県唐津市で開催された班会議の時には、虹の松原を完走した者に賞品を出すということになった。私も、阪大の若手の方と一緒に走った思い出がある。写真 1 は、その唐津からの帰りに、関門大橋のたもとで撮影したものである。

写真 1 (右) : 唐津で開催された班会議からの帰り、関門大橋のサービスエリアにて (1981 年ころ)。左から、下河内稔先生 (大阪大学人間科学部教授当時)、千葉先生、富岡。



写真 2 (下) : 山口大学で開催した国際シンポジウムの集合写真(1991 年 11 月)。前列左から Jeff Hall、3 人目 Mike Menaker、5 人目、Arnold Eskin、Greg Cahill、Gene Block、Jay Dunlap、二列目左端に千葉先生、3 人目 Terry Page、6 人目 Otto Friesen。日本人のお名前は紹介しないが、お顔からお分かりになると思います。



さて、千葉先生ご自身は、蚊のリズムを制御する複数振動体に強い興味をお持ちだった。アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) やチカイエカ (*Culex pipiens molestus*) が示す明け方のピークと日暮れのピークが、条件によって違った振る舞いをする、また場合によっては異なる周期で自由継続することを発見され、その背後に異なる振動体があるという仮説を提出されていた。これは今日常識となったショウジョウバエの E-M 振動体説に先立つ研究であった。さらに、アカイエカ雌では交尾後に双峰性の活動が夜行性に变化することを発見され、その変化が交尾により雄から受け渡される物質に由来することを明らかにされた。その物質については、当時東大農学部におられた長澤寛道先生との共同研究で明らかにしようとされていた。一方、蚊の時計の所在についても、脳の部分切除実験により探索を進められた。この実験は当時大学院生であった笠井聖仙さん(現鹿児島大学理学部)が担当し、時計は視葉以外(おそらく脳葉)にあることを示された。余談になるが、この研究は当時 TBS 系列で放送されていた大橋巨泉のクイズダービーの3択問題にも取り上げられ、山口大学千葉教授の名前が全国のお茶の間に鳴り響いた。千葉先生は、こうした一連の研究により1987年に日本動物学会賞を、1990年には中国新聞賞を受賞された。さらに2007年だったと思うが、時間生物学の発展への貢献で、Aschoff-Honma 記念財団から Aschoff and Honma Honorary Prize も受賞されている。

千葉先生は、山口大学での管理運営にもお力を発揮され、1982年の修士課程設置や1997年の博士課程設置のために多大な貢献をされた。博士課程は先生の在任中には設置には至らなかったが、学位取得のための指導にも熱意を示された。そのおかげで私も北大で学位を取得することができた。私の他には当時中外製薬に勤務されていた池田勇五さんが、千葉先生の指導の下に、ラットの概日リズムの研究により1982年に東北大学で学位を取得されている。池田さんは d-amphetamine が活動リズムに強い影響をもたらすことを発見されたが(Ikada and Chiba, 1982)、これがのちに本間研一先生の methamphetamine 依存性振動体の発見に繋がったと記憶している。

千葉先生は、附属図書館長、理学部長を歴任され、学部および大学の発展に力を注がれた。学部長をされたのは退職間際の1994年ころで、大学の大綱化を始め激動の時代で、全国的に学科再編などの大きな動きが始まった時期であった。千葉先生は、学部内の再編を進められ、生物科学科は物理学科と融合して、全国

的にも珍しい構成の自然情報科学科に再編された。この再編により入学定員の増員と、教員の増員も認められた。これによって新生の生物科学講座に三菱化成生命科学研究所から井上慎一先生をお迎えすることができた。井上先生は千葉先生が確立された山口大学の時間生物学をますます発展させたいとの強い志をお持ちで、そのご尽力によって全国でも珍しい時間学研究所が設置された。その設立記念シンポジウムでは、千葉先生にもご講演をいただいた。

学会活動では、本学会の前身である生物リズム研究会から、その設立や運営に深く関わってこられ、1994年からは生物リズム研究会と臨床時間生物学研究会の融合によって誕生した日本時間生物学会の初代会長を務められ、我が国の時間生物学の発展に尽力された。前後するが、1992年には、千葉先生、Terry Page、それに私がオーガナイザーとして山口大学で国際シンポジウム「Connections between genetics and physiology in the study of biological clocks」を開催した(写真2)。米国から G. Block, J. Hall, M. Menaker, J. Dunlap, T. Page, G. Cahill, A. Eskin, O. Friesen などそうそうたる研究者を招聘し、日本側からも当時の精鋭の先生方に参加していただいて、日米の時間生物学研究者の交流と新たな研究の発展の契機となったことが記憶に強く残っている。ちなみに、J. Hall と J. Dunlap は畳の部屋に泊まってみたいとのことで、会議終了後に山口大学にほど近い湯田温泉の老舗旅館、松田家に宿泊してもらったことを思い出す。

千葉先生は研究以外にも測り知れない才能をお持ちだった。いくつもの時間生物学関連の著書を著され、そのうちの一つ「生物時計の話」では、毎日出版文化賞を受賞されている。それらの文章には先生の文才がにじみ出ている。例えば、培風館から1979年に出版された「昆虫時計」の序章の冒頭には、『潮騒一潮の満ちてくるときに波の立ち騒ぐこと。この言葉をもじって語呂はあまり良くないが「虫騒」と私がひそかに呼んでいる現象がある。それは6月中旬から下旬にかけて山に囲まれた田園地帯で起こる。夕方近くになると、周りが虫のはばたく音に包まれるのだ。』とある。先生ならではの感性のなせる業と、深く感じ入ったことを思い出す。また、芸術にもとりわけ優れた才能をお持ちで、退職前から水彩画、油彩画に素晴らしい作品を残された。中公新書の「からだの中の夜と昼 — 時間生物学による新しい昼夜観」は文章のみならず挿絵も先生ご自身によるもので、この本自体が先生の類まれな才能を雄弁に物語っている。先生は、しばしばマグリットの「光の帝国」を引き合いに出されて、時

間を題材とした絵画の素晴らしさを口にしておられたが、ご自身の作品に時間生物学で培われた感性を加え、独自の作風を確立された。数々の展覧会に出品され、さまざまな賞を受賞された。もうかれこれ 25 年ほど前になるが、私がまだ山口大学に勤務していたころ、突然千葉先生からお電話があり、是非山口県立美術館で開催されている美術展を見に行きたくて欲しいとお誘いを頂いた。そこに出品している作品は私には理解できるから、とのことであった。早速出かけてみると、大きなキャンバスに、白色を背景にしてアカイエカの双峰性のアクトグラムと虹が描かれていた。作品名は確かサーカディアンリズムだったと記憶している。退職後に、ご自宅にアトリエを構えられた先生は、数多くの作品を制作されたが、私が見せていただいた作品のほとんどが生物と時間に関わるものだった。ソフトなタッチで、ある種幻想的な作品であった(写真 3)。ご自宅を訪ねた折には、「作品がある程度溜まると、個展を開いてそれらを売って、得たお金でまた画

材を買って新しい作品を制作するんだ。」と言っておられた。そして、ふた言目には決まって、「君も退職後に何をするか、今から考えておいた方がいいよ。」とおっしゃった。その頃は‘今’をやり過ごすことに精一杯で、とても先のことを考える余裕などなかった。私も既に退職して 2 年目になるが、その時真面目に先生の忠告に従っておけば良かったと、今更ながら後悔している。

先生と直接お会いしてお話ししたのは、2016 年 9 月に山口市で開催された生物リズム若手研究者の集いが最後となってしまった。その時既に 85 歳だった先生はだいぶお年を召されてはいたが、生物リズムの研究を楽しむご様子は、お若いころと全く変わりはない。おそらく最後まで、生物リズムには深い思いを寄せられていたことと思う。先生が設立と運営にお力を注がれた本学会がますます発展することを祈ってやまない。先生のご冥福を心より祈るものである。



写真 3 : 私の動物学会賞受賞を記念して、千葉先生から頂いた「体内時計」(2010 年の作品)の複製

私のスターナビゲーション—千葉喜彦さんの思い出—

沼田 英治[✉]

京都大学 人と社会の未来研究院

千葉喜彦さんへの追悼文の執筆依頼が、重吉康史編集委員長からあり、富岡憲治さん、松本顕さんも書かれるとのことであった。私は千葉さんから直接教えを受けたわけではないし、とても荷が重いからとお断りしようかと思ったが、私の科学者人生において、あこがれの存在であった千葉さんの追悼文を書くことはとても光栄なことだと思いなおし、遠くから見えた立場から書かせていただくことにした。本学会にとっては、千葉さんが設立者の一人で、初代理事長であったことが最も重要なことだろうが、ここでは私の人生に千葉さんが与えた影響を中心に書くことをお許し願いたい。受けたご恩からは千葉先生とお呼びすべきと思うが、ここでは、親しさを込めてあえて千葉さんと呼ばせていただきたい。

わが国の時間生物学の草分けは、理学分野に限ると東北大学の加藤陸奥雄さんと京都大学の森主一さんであることは衆目の一致するところであろう。千葉さんは加藤さんの門下生にあたる。また、私が1974年に京都大学理学部に入学した時の学部長は森さんであったが、専門課程に進む時に定年退官されたので、残念なことに直接授業を受けることができなかった。その後、私の研究生活は昆虫の内分泌学で始まったが、やがて時間生物学に近づいていくことになった。大学院生であったころから、毎年日本動物学会大会に参加し、山口大学の千葉さんとその研究室の人たちによる時間生物学の発表を興味深く聞かせてもらっていた。

私が千葉さんとその研究室に惹かれた一つの理由は、教授の千葉さんは東北大学出身で加藤さんの流れをくむ生態学分野の方であるにもかかわらず、助教授には名古屋大学出身の内分泌学者の遠藤克彦さん、助手には岡山大学出身の神経生物学者の富岡憲治さんを採用して、多様な考え方や実験方法を駆使して時間生物学に挑んでいた点である。その当時、千葉さんと特に親しく言葉を交わした記憶はないが、遠藤さん、富岡さんも含めて学会のたびに会いするのが毎年

の楽しみの一つになっていた。

私が大学院生の時には、まだ日本学術振興会特別研究員制度はなかった。研究室や周囲の先輩たちの多くは学位取得後も京都大学に研修員（無給、研修料を支払う）の形で残って、アルバイトをしながら研究を続けていた。しかし、私は、大学院生時代の指導者教官以外にもスケールの大きな研究者の影響を受けたいと思っていたので、学位を取得してすぐに職が得られなければ、別のところに移りたいと考えていた。その第一候補が千葉さんのところであった。結局、私は学位を取得する直前に大阪市立大学の助手に採用され、山口に行きたいと思った話はしないままになっている。

千葉さんはその後、門下生の松本顕さんを教務員に採用してさらに研究室を充実させた。博士課程のなかった山口大学で松本さんのような後継者を育て、しかも松本さんは千葉さんとは違う分子生物学を得意とするのは、松本さん自身の研究能力の高さはもちろんであるが、千葉さんの指導者としての能力の高さと学問的な幅の広さを示している。

若いころの私は、科学者は地道に自分の研究課題に取り組むことこそが仕事だと考えていた。しかし、大阪市立大学で独立した研究室を持てるようになった時、何人かの教員と一緒にチームを組めるような研究室づくりも、学問の発展には重要だと気づいた。そこで、最初に神経生物学分野の志賀向子さんに岡山大学から来てもらい、もう一人採用できるようになった時には、分子生物学者の後藤慎介さんに北海道大学から（オハイオ州立大学経由で）来てもらった。正直に言うと、これは完全に千葉さんの真似であった。

また、千葉さんを語るときには、多くの著書を語らないわけにはいかない。私は、とりわけ、「生物時計—サーカディアン・リズムの機構」に感銘を受けた。誰から聞いたのかは忘れたが、これは岩波書店への持ち込み原稿であったそうだ。通常岩波は持ち込み原稿を

✉ numata.hideharu.8r@kyoto-u.jp

出版しないにもかかわらず、例外的に認めたらしい。前述のように、私は科学者の仕事を狭くとらえていたので、実験・観察をして英語で原著論文を書くことだけが義務で、それ以外はやってもやらなくてもよいと考えていた。後に、総説や著書、訳書の重要性を理解するようになったが、残念ながらいまだに単著で専門書を書いた経験はない。この「生物時計」は1975年7月発行であるから、出版時点で千葉さんは43歳ということになる。書こうと決心されたのはそれより以前あったことを考えると、学問を普及させることの重要性に早くから気づいておられたのであろう。このほか単著のものだけでも、中央公論社「生物時計の話」、「からだの中の夜と昼—時間生物学による新しい昼夜観」、東海大学出版会「生物と時間—ジョージア大学便り」、さらには子ども向けのさ・え・ら書房「蚊も時計を持っている」があり、いずれも名著で、今読んでもまったく古さを感じさせないが、子ども向けの1冊以外はすべて絶版なのが残念である。

1990年代の終わりに、私はヒメマルカツオブシムシの概年リズムの研究を始めた。その話を学会で千葉さんにしたところ、「加藤陸奥雄さんもこの虫の周期性を研究されていた」と文献を紹介してくださった。私にとって加藤さんは、昆虫の周期性研究の草分けとして、あるいはむしろ東北大学学長や大学入試センター所長として認識していたが、この研究のことはまったく知らなかった。私の不勉強をさらけ出したようで恥ずかしかったが、偉大な先人たちの業績を知ることの重要性を改めて認識した。ちなみに、加藤さんも森主一さんも終戦の直前に学位を取得されており、戦争中も研究を続けておられたことが印象に残っている。そのほか、千葉さんとの懐かしい思い出として、2003年に富岡さんが山口大学から岡山大学に移る際の送別会に、私も参加させていただき、遠藤さん、井上慎一さんらとお会いしたことが強く印象に残っている(図1)。なお、哺乳類の視交叉上核研究で有名な井上さんは1995年に千葉さんの後任として三菱化成生命科学研究所から山口大学に移っている。

千葉さんが山口大学を定年退職されてからはお会いする機会は減っていった。生物学からは完全に引退

されて、絵を描いておられ、著名な展覧会にも出品され、受賞もされていると聞いていた。画家としても趣味の領域ではなかった。フェイスブックで「友達」になり(図2)、たくさんの素晴らしい作品を見せていただいた。一度しかない人生において一つことができればそれでよいという考えもあるだろう。しかし、定年を機にこれまでの人生に区切りをつけ、充実した第二の人生を送ることも素晴らしいと思う。私も昨年定年退職して、ますますその思いは強くなっている。充実した第二の人生という意味でも千葉さんは私のあこがれの人であり続けている。

2017年に第24回日本時間生物学会学術大会を京都大学で開催した時には、お願いしてポスターのための絵を描いていただいた(図3)。この絵はポスターに使用したほか、ポストカードとして参加者に配布し、「時間生物学」23巻2号の裏表紙にも採用された。元の絵は、千葉さんをお願いして私がいただいて、額に入れ、わが家の宝物になっている。ご本人も大会に参加していただく予定になっていたが、自転車の転倒事故があつて残念ながら来ていただけなかった。

千葉さんと最後に直接お会いしたのは2013年に近畿大学で開催された第20回日本時間生物学会学術大会の時だったと思う。既に生物学からは引退されて本職は画家であったかもしれないが、懇親会での乾杯の音頭を取られる際に、「概日時計の分子機構の研究は著しく進んだが、時間生物学のそのほかの分野にはまだまだ解決すべき課題が残っている」と発言されたと記憶している。生態学者の加藤さんから千葉さんという学問的な流れの中で、野外での生活と密着した時間生物学研究の重要性を指摘されたのだらうと推測している。少しずつではあるが、本学会でもそのような観点の研究が増えてきているように思うので、千葉さんも喜んでくださっているのではないだろうか。

輝く星(スター)は遠くにあつても光は届く。その光を目指して飛んでも近づくことはできないが、それを頼りに飛ぶべき方角を知る鳥もいる(Sauer and Sauer 1961, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 25:463-473)。そういうスターと出会えたことが私の幸せである。



図1 山口大学から岡山大学に異動する富岡憲治さんの送別会(2003年3月11日、当時山口県阿知須町にあったレストラン「あじす葡萄の森」にて)。左から富岡、沼田英治、千葉喜彦、井上慎一、遠藤克彦。



図2 千葉喜彦さんのフェイスブックのプロフィール写真。2013年8月19日に「私の仕事場です。」というコメントつきでアップロードされた。



図3 Rhythmicity and Homeostasis (千葉喜彦)。第24回日本時間生物学会学術大会のポスターのために描いていたパステル画。

追悼一堀忠雄先生

林 光緒[✉]

広島大学大学院 人間社会科学研究所

2021年6月29日、堀忠雄先生が76歳で永眠されました。長年、堀先生のご指導を受けながら一緒に研究を続けてきた身として、先生のご研究の足跡をたどりたくと存じます。

堀先生は、本邦における睡眠学の黎明期から睡眠研究に携わってこられた心理学者です。これまで内観に頼るしかなかった意識心理学に対して、客観的な指標を用いて意識の変遷過程を明らかにしようとされました。それが入眠期や、睡眠中の注意機構、レム睡眠中の夢、日内リズムの研究へとつながっていきました。

学部・大学院時代を過ごされた早稲田大学では、睡眠中の皮膚電気活動の研究をされ、指導教員の新美良純先生とともに、睡眠全体を包括する専門書、「睡眠、その生理心理学」¹を執筆されました。その当時、Rechtshaffen & Kales (1968)の睡眠脳波アトラス²の邦訳版³は刊行されていましたが、本邦では睡眠に関する専門書がほとんどない時代のことでした。

福井大学に赴任されてからは、脳波を用いて入眠期における意識の変遷過程に関する研究を始められました。その研究は、1982年に広島大学に異動されてからも続けられ、堀先生が策定された9段階の入眠期脳波の判定基準⁴は、現在、Hori stageとして国内外で用いられています。

林が広島大学に入学したのも1982年で、1984年の学部3年次に堀先生の研究室に入れていただきました。ちょうどその年に隔離実験室が完成し、堀先生は入眠期の研究とともに、意識状態の日内リズムに関する研究⁵を始められました。日本時間生物学会には、1994年の第1回設立記念学術集会から毎年参加され、知覚や認知、眠気に関するウルトラディアンリズムやサーカセミアンリズムに関する研究成果を発表されました。

90年代後半からは、仮眠の効果⁶に関する研究に着手されるとともに、事象関連電位を用いて睡眠中の注意機構⁷やレム睡眠中の夢の発生機序⁸に関する研究に取り組みされました。

2008年に広島大学を63歳で定年退職される際、その記念として堀先生のご研究の集大成になるような専門書を作ろうと、卒業生の間で話がまとまりました。堀先生に編者になっていただき、堀研究室のもとで博士号を取得した卒業生一同で執筆を担当したのが、「睡眠心理学」⁹です。堀先生には、第1章「睡眠心理学とは」をご執筆いただきました。

「睡眠心理学」という名称は、「新生理心理学2 生理心理学の応用分野」¹⁰の「2部 睡眠心理学への応用」(p.63)と、「7章 睡眠心理学の歴史と発展」(p.64)に使用されていますが、この名称が書籍の表題として使われたのは、この本が初めてです。堀先生のご研究を概観したとき、この名称が一番ふさわしいのではないかと広島国際大学の田中秀樹教授と私とで考え、堀先生には後にご承諾いただきました。

このように「睡眠心理学」の発刊は、卒業生が勝手に話を進めたのですが、堀先生がこの本についてどのように思っておられたのか、聞きそびれてしまいました。そのことが心残りです。喜んでいただけたのではないかと思っはいるのですが。

ご定年後は、2012年まで福山通運澁谷長寿健康財団睡眠科学研究所所長を務められ、初学者¹¹や、一般読者を対象とした書籍^{12,13}を出版されるなど、啓蒙活動に当たられました。また、2006年に一般社団法人日本睡眠改善協議会を立ち上げられ、その理事長として「睡眠改善インストラクター」の育成にご尽力されました。

堀先生は、睡眠に関する数多くの研究業績を残され、多数の優秀な卒業生を育てられました。師としても、研究者としても、とても尊敬しておりました。先生のお話を伺うことができなくなってしまったことがとても残念です。ご冥福をお祈りします。

参考文献

1. 新美良純、堀忠雄. 睡眠 その生理心理学. 培風館 (1974).

✉ mhayasi@hiroshima-u.ac.jp

2. Rechtschaffen, A., & Kales, A. *A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*. (Washington, D.C.: Public Health Service, U.A. Government Printing Office, 1968).
3. 清野茂博訳. 睡眠脳波アトラス 標準用語・手技・判定法. 医歯薬出版 (1971).
4. Hori, T., Hayashi, M., & Morikawa, T. Topographical EEG changes and the hypnagogic experience. In: *Sleep onset: Normal and abnormal processes* (eds R. D. Ogilvie, & J. R. Harsh), 237-253 (Washington, D.C.: Psychological Association, 1994).
5. 堀 忠雄. ねむけの心理学. *心療内科* **5**, 78-85 (2001).
6. 林 光緒, 堀 忠雄. 午後の眠気対策としての短時間仮眠. *生理心理学と精神生理学* **25**, 45-59 (2007).
7. 堀 忠雄. 睡眠中の注意 (見張り番機構) と事象関連電位. *基礎心理学研究* **19**, 60-65 (2000).
8. 小川景子, 入戸野宏, 堀 忠雄. レム睡眠中の夢—視覚心像の生成過程—. *生理心理学と精神生理学* **25**, 5-15 (2007).
9. 堀 忠雄 編 睡眠心理学. 北大路書房 (2008).
10. 柿木昇治, 山崎勝男, 藤澤 清編. 新生理心理学 2 生理心理学の応用分野. 北大路書房 (1997).
11. 堀 忠雄. 生理心理学-人間の行動を生理指標で測る. 培風館 (2008a).
12. 堀 忠雄. 眠りと夢のメカニズム. ソフトバンククリエイティブ (2008b).
13. 堀 忠雄. 安眠健康術. 海竜社 (2011).



学会のあと堀先生を囲んで (2002.5.22)
早稲田大学で開催された第 20 回生理心理学会大会のあと、堀先生を囲んでのスナップ。堀先生は左から 2 番目。左端は広島大学の坂田省吾先生、堀先生の右側は広島大学の小川景子先生、右端が理化学研究所の玉置應子先生。



広島大学ご退職日 (2008.3.31)
広島大学ご退職日に、林の実験室で「睡眠心理学」にサインをいただいているところ。



堀研究室と林研究室の合同合宿 (2007.8.28)
温泉旅館で、睡眠段階判定の勉強合宿を行ったときの集合写真。真ん中が堀先生。右端が林。

追悼—堀忠雄先生

田中 秀樹[✉]

広島国際大学 健康科学部

2021年6月29日、堀忠雄先生が76歳で永眠されました。76歳でした。1年以上の月日が流れましたが、堀門下生の一人として、先生との思い出を綴りたいと存じます。「堀先生に出会っていなければ、今の自分はありません・・・」、一人のかみしめるような言葉を発端に、「俺もだよ!」「僕もです!」としみじみつづく。堀忠雄先生のお通夜には、大学や研究所で研究、教育に携わっている堀研究室出身者が全国からお別れに駆けつけました。「睡眠心理学」(北大路書房, 2008)は、堀先生のご指導のもと博士号を取得した門下生12名(広島大学の林光緒先生、小川景子先生、駒沢大学の岩城達也先生、産業技術総合研究所の甲斐田幸佐先生、福島大学の高原円先生、理化学研究所の玉置應子先生等が大学や研究所で睡眠や生体リズムの研究に従事)が執筆していますが、その大半が通夜、葬儀の場にいました。堀先生が指導された最後の博士号取得者、阿部高志先生(現:筑波大学)もおられました。国際学会では、いつも自然と一緒に行動しているメンバーでの会話でしたが、現実を受け止めきれず、ぼっかり穴があいた感覚に包まれていました。北海道大学の松浦倫子先生、労働安全衛生総合研究所の池田大樹先生も堀先生の後継者の林先生のご指導で学位を取得した孫弟子、堀門下生です。

堀先生の研究への姿勢、指導は徹底していました。データに真摯に向き合う姿勢はもちろんですが、データ解釈にも慎重で、「別のデータ分析もやってみて」、「ローデータから見直してみても」と指導されることもありました。意欲的な高齢者の多くが30分以内の昼寝をとっているとの結果が出たときには、当時、高齢者の昼寝はnegativeなイメージがあった時代でしたので、「データ入力からもう一度やり直してみても」と指示され、堀研究室全員でデータ入力からやり直しました。しかし、再分析の結果は、高齢者の30分以内の昼寝がPositive、1時間以上の昼寝はnegativeに機能することを示すデータでした。堀先生は、覚悟を決め、そのデータをもって科学技術庁の研究発表会に

いかれました。ドキドキしながら見送りましたが、堀先生は朗報と共にかえって来られ、「〇〇大学もうちの結果を支持するようなデータ出していたよ。良い発表になったよ、ありがとう」と皆をねぎらってくださいました。これは25年以上たった今も忘れることのない思い出で、私の高齢者の睡眠研究のスタートにもなりました。堀先生は、学会発表に関しても、熱心に丁寧に指導していただきました。「原稿用紙400字あたり、話口調で1分」、「図の縦軸、横軸をしっかりと説明し、これをご覧になると、〇〇ということがわかります。そこで、次に・・・の流れ」、「次に出るスライドを聴衆が想像できるように話さない」、「発表原稿はスライドと対応させて丸暗記」、いずれも大学院生の時代に堀先生に教えていただいたことです。広島大学を退官されるまで、学会、出張中の堀先生のカバンの中には、いつも大学院生の論文原稿が数本ありました。航空機や新幹線での移動時間にも論文添削をされている姿を拝見することは珍しくありませんでした。

「こうすれば、こうなる!を実感させることが大切」これは、私が広島大学の助手の時にお酒の席でお聞きした堀先生のお言葉です。二人とも結構酔っぱらっていましたが、不思議と覚えています。堀先生は、研究者、教育者人生の道標でもあります。私が広島国際大学に就任した際に、堀先生からいただいたお言葉「田中さん、学生指導に大切なのは忍耐と根気です。日々、忍耐と根気だよ」を肝に銘じ20年以上学生指導に関わってきましたが、堀先生の忍耐と根気の日々の中で私たちは育てられ、今の自分があること、そして堀先生に学んだ行動科学者としての責務を痛感させられます。

堀先生のもとで、大学院生、助手として同じ空間でご指導をいただいた期間は6年でしたが、その後の20年以上にわたり、常に見守り、様々な環境を整えていただき、根気強くご支援していただきました。1998年、堀先生は、国立精神神経センター精神保健研究所の白川修一郎先生の元で学ぶ機会を与えてく

✉ t-hideki@hirokoku-u.ac.jp



The World Federation of Sleep Research and Sleep Medicine Society, 2007 年ケアンズ
堀先生（中央右）、白川先生（中央左）、玉置先生、阿部先生（左端から）小林先生、田中（右端から）、小川先生（前列左）、松浦先生（前列中央）

ださりました。当時の国立精神神経センターには、高橋清久先生、大川匡子先生、内山真先生、朝田隆先生をはじめ、錚々たる先生方がおられました。「田中君、エベレスト、ヒマラヤ山脈、体感してきなさい」。東京に赴く際に堀先生にいただいたお言葉です。

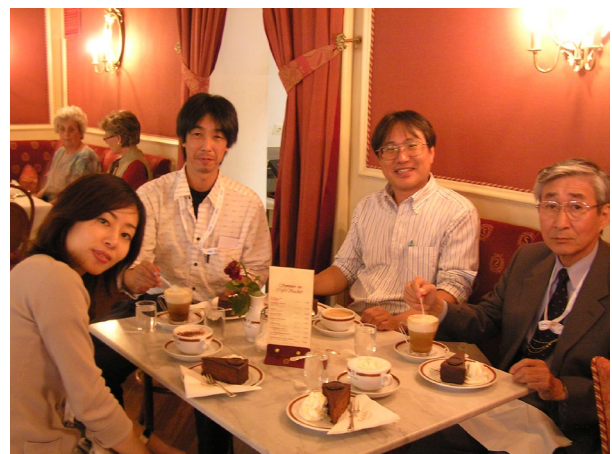
2001年に私が広島国際大学に着任してからは、折に触れお声をかけてくださり、林先生も交えて、合同の研究会を実施していただきました。退官記念講演を聴講した本学の学生15名中、7人が大学院に進学したことも印象的で学問の魅力を伝える堀先生の力量を実感しました。2012年3月、福山通運澁谷長寿健康財団睡眠科学研究所所長を引退される際に堀先生に呼ばれました。「田中さん、必要なものは、全部持

っていきなさい」と堀先生個人所有の Sleep 等の論文の製本（本棚1個分）と20世紀前半も含む様々な論文のコピーがギッシリ詰まった段ボール3つをいただきました。これが堀先生自身研究者としての一つの区切りだったのかもかもしれません。この引っ越しに連れて行った広国大生の一人に田村典久先生（現：広島大学）がいたことにも運命を感じます。彼は、本学で学位を取得後、東京医大で、井上雄一先生や駒田陽子先生をはじめ、高橋清久先生、大川匡子先生のご指導も受けています。現在の広島大学では、林光緒先生の多大なご支援を受けています。これも堀マジックではと、未来へつながり、希望も感じております。堀先生がつかないでくださったものの尊さを感じる日々が続いていくことでしょう。

堀研究室は、大学院で堀先生のご指導を受けようと、他大学、他分野からも学生が集まる研究室でした。私もその一人ですが、鹿児島大学の理学部で味覚研究をしていた大学4年生の時でした。「堀忠雄先生のもとで、学びたい！もっと知りたい！」ある本を読み終え、熱い想いがこみ上げました。早速、「脳と心のトピックス100」（堀 忠雄、斉藤 勇（編集）誠信書房1989/12/1）の著者である広島大学の堀忠雄先生に手紙を書き、お会いし、ワクワクするような興味深い話をたくさんしていただきました。あれから30年…以上たちますが、心が躍ったあの瞬間は今も鮮明に残っています。学位を取得し、広大を巣立った修了生に、常に心を配り、有形、無形のご指導、ご支援を根気強くしていただいた堀先生、感謝に堪えません。ご冥福をお祈りいたします。



The European Sleep Research Society, 2006 年インスブルク
堀先生（中央右）、白川先生（中央左）
林先生（左列前）、甲斐田先生（右列中央）



The European Sleep Research Society, 2006 年インスブルク
堀先生（右前）：林先生（中央右）
玉置先生（左前）：田中（中央左）

堀先生の情熱と人間らしさ

小川 景子[✉]

広島大学大学院 人間社会科学研究科

堀忠雄先生は、研究者であり教育者であり、等身大の人間でいらっしゃいました。私が大学3年生でお会いした時、堀先生は確か55歳でした。その時の堀先生は、ロマンス・グレーの髪の毛で小柄な紳士といった様子でした。大学生の私たちからすると、実年齢の10歳くらい上の風格にみえました。それ以降は永遠の55歳でした。椅子にちょこんと座っておられ、女性の学生さん達からは「かわいい」とよく言われておられました。もちろん、研究室に所属して研究を進めれば進めるほど、そのお姿はかわいいどころではなく、どんどん大きくなっていきました。

先生の授業は、どう頑張っても眠くなるので、「声の周波数に何か仕掛けがあるんじゃないか」、「わざと寝させようとしているのではないか」、「さすが睡眠研究者」、とみんなで言うていました。いくら授業を聞こうとがんばっても、気が付いたら入眠しています。そんな中、先生の授業で生涯の研究テーマに出会えたことは私にとって宝でした。まどろみながら、これだ！と思ったのを覚えています。一方で、最先端で専門的なお話も、先生の話術にかかれば、小学生から高齢者まで、皆さんが面白い！というご講義になりました。真面目な話の途中に入る不意の冗談に、皆さんがクスツとして、そんな皆さんをみて、先生がニヤリとされる、そんなやり取りもありながら、誰もが引き込まれる講義になっていったのだらうと思います。

先生のところには、様々な相談事が舞い込んでいました。大学や学会関係の案件だけでなく、研究室内外問わず学生さん達の相談、突然やってくる知らない方からのお手紙にも真摯に対応されていました。先生はとてもお忙しいはずなのに、相談のたびに手を止めてじっくり話を聞いてくださっていました。あるとき私自身も2、3時間くらい話を聞いてもらった（話してくださった）ことがありました。聞いてもらった後、先生の部屋を出てドアを閉めた瞬間、「あれ、何でお伺いしたんだっけ？」となっていました。何はともあれ、よし、またがんばろうといつも思えました。時々、

同じ学部のキノコ研究の先生が「堀さ〜ん」と言って研究室にいらっしゃって、「僕もさー」「いや、実は僕もさー」と、お二人で体の痛い所自慢しておられるのが楽しく、なんだかほっとしました。

先生は、動物や植物もお好きで、定年退職したら土いじりをして過ごしたい、とおっしゃっていました。ただ、周りにいた誰もが「(研究のことが頭を離れるわけないだろうから)絶対無理だろう」と確信していました。研究も、教育も、植物も手間をかけて応答をきくのがお好きだったのかもしれませんが。ご定年後に先生のお宅へお伺いした際、息子さんが「毎日パソコンに向かっている」とおっしゃっていました。

そんな先生が羽目を外してすごく楽しそうにされるのが飲み会でした。大学では教育者の側面が強い堀先生ですが、学会では第一線の研究者であり、研究を楽しみ、一喜一憂する少年のような方でした。私がお会いした頃の堀先生はHori stageもでき、お昼寝の研究も定着し、研究室には多くの人が集まり、研究者として育ってっていました。でも、その人生は山あり谷ありの連続でいらっしゃったのではないかと思います。先生は、とことん研究して、悩んで、飲む(お酒)、等身大の人間でいらっしゃったように思います。ご苦労と努力の分、一言一言に力があり、皆さんの心に響いたのではないかと思います。そして、常に5年後、10年後、さらにその先をみておれたと思います。最近、先生が書かれた文章を読む機会がありました。「この時点ですでにここまで考えておられたのか」とびっくりしました。預言者かと思いました。日頃は自分を律し、飲み会で楽しく発散して、またがんばる。そして、冷静にデータと数年先をみる、この繰り返しでいらっしゃったように思います。

堀先生は睡眠で世界は変わる、変えたいと考えておられたと思います。お葬式の時、とても悲しかったと同時に、その情熱に対して「まだ何も自分からご報告できることがない」と思いました。まだまだ教えて頂きたいことばかりでした。先生ならどうおっしゃるか

✉ ogawakeicom@hiroshima-u.ac.jp

など考えながら、過ごしていこうと思います。そして、先生のように論文や書物だけでなく人の心にも残る研究者になれたらいいなと思います。

1999年に堀先生が大会長をされた第24回日本睡眠学会（広島大学）に私も学生でお手伝いしました。

私の人生初学会でした。そして2025年に今度は林光緒先生が大会長で、同学会（第49回日本睡眠学会）を同じく広島大学で開催されます。堀先生がいらしゃったら、「ほっほっ」と1番に喜んでおられたらいいなと思います。



ほぼ昔のままの堀研実験室

工藤崇博士を偲んで

田原 優¹✉、中村 孝博²✉、柴田 重信³✉

1 広島大学大学院 医系科学研究科 公衆衛生学

2 明治大学 農学部 動物生理学研究室

3 早稲田大学 先進理工学部 生理・薬理研究室

工藤君が、2022年5月16日に永眠されました。そこで、学生時代の研究指導者であった私と、工藤君と研究仲間であった中村孝博先生、田原優先生にも追悼文を書いていただき、故人を偲び、ここに御冥福をお祈りしたいと思います。

工藤君は2003年に人間科学部の最後の卒業研究の学生として、柴田研に配属されました。私の移動に伴い、理工学研究科の電気・情報生命専攻の一期生として修士・博士に進学しました。修士は1.5年で終わり、2007年9月に博士終了後、直ちに10月にGene Blockの研究室のポスドクになりました。また、文科省の「頭脳循環加速の若手研究者・・・」博士一貫課程で、カリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA)のColwellラボに柴田研から多くの学生が派遣され、共同研究を通して工藤君には大変お世話になりました。工藤君はUCLAに都合10年間在籍し、PIポストを採す努力をしていましたが残念ながらそれは叶わず、日本に帰国しました。渡米後間もなくして、非常に珍しい嗅神経芽細胞腫になり手術を受け、その後も研究活を続けていました。最近日本の大学の特命助教のポジションが終了して松山の実家に帰省後、細胞腫の再発が原因で亡くなられたそうです。彼の推薦書を和文や英文で書くことが多々あり一部を記載すると以下のようになり、自慢の教え子のひとりでありました。「工藤博士は精力的によく働き、また多くの学生をグループとしてまとめて指導していたので彼の研究とその生産性には大変驚かされました。その研究能力の高さから工藤博士は博士課程在学中に私の研究室で助手になることができ、博士課程修了までの1年半立派にその役割を務めました。工藤博士は博士課程在学中に14報の論文を報告し、そのうちの5報は筆頭著者であります。」(柴田重信)

工藤さんとの最初の出会いは、お互い大学院生であった時、滋賀で行われた第11回日本時間生物学会学術大会でした。懇親会で留学から帰ってきたばかりの中村渉先生(当時、北海道大学)を捕まえて、バージニア大学のGene Block先生の研究室での生活について、根掘り葉掘り聞きました。最初の工藤さんの印象は、物静かだけど内に秘める闘志がある人だなということでした。その次の年(2005年)、私はBlock研究室に留学し留学生生活を開始しました。2007年8月、Block先生の異動に伴い私も一緒にUCLAに移り、Block/Colwell研究室をスタートさせました¹。

ラボのセットアップもままならない2007年10月に、工藤さんがロサンゼルス(LA)の地に降り立ちました。Block/Colwell両先生から彼のお世話役を任された私は彼にあれこれと説明し、早く研究が開始できるようにしました。普通の人であれば、アパートを決めたり、銀行口座を開いたりなど米国の生活に慣れるのに最低でも1ヶ月はかかりますが、彼は時差ボケが治るよりも早くLAでの生活に適応し、実験を開始していました。この後、私がLAを去る約2年半の間、彼は、土日など関係なく毎日、8時前にラボに現れ、22時に帰宅するという生活を送っていました。その後も体が許す限り継続されていたと思います。彼の研究に対するストイックさは私が知っている研究者の中でも群を抜いています。私の研究もよく手伝ってくれて、私がUCLAで実験し発表した3報の原著論文に工藤さんが共著者になっています^{2,4}。ストイックで物静かな工藤さんでしたが、遊びに誘うと断ることなくいつも参加してくれました。侍JAPANがワールドベースボールクラシック(WBC)で優勝した時(2009年)の準決勝アメリカ戦をドジャースタジアムに観戦しに行った時は、前のめりになり侍JAPANを一生懸命応援していました。普段見ない工藤さんの

✉ yutahara@hiroshima-u.ac.jp、takahiro@meiji.ac.jp、shibatasa@waseda.jp

姿を見ることができ、少し嬉しかったことを今でも鮮明に覚えています。

2014年に私が明治大学に異動すると、日本での面接の合間に私のラボを訪問してくれました。その後もメールのやり取りはしていましたが、それが彼と話した最後になってしまいました。ラボで苦楽を共にした学友として工藤崇さんの研究に対する姿勢を尊敬しています。工藤さんの生き様は、レジェンドとして私のラボの学生に語り継ぎたいと思っています。最後に「工藤さん、ありがとう。どうぞ安らかにお休みください。」（中村孝博）

工藤さんとは、学部生の1年間（柴田研にて）、博士課程の1年間（UCLAにて）、研究生活を共にさせて頂きました。私にとって柴田研で一番年齢の近い博士の先輩が工藤さんであり、研究者としての道を教えてくれた方でした。まだ研究室に来て数回目の私に、ストップウォッチを構えて、マウスの脳をいかに早くサンプリングするかを教えてくれたのが工藤さんでした（学部生の私には衝撃的なトレーニングでした）。工藤さんは正月も関係なく朝から夜中まで研究室に居て、とても勤勉な方でした。その生活はUCLAでも変わらず、また永眠される直前でもそうだったと聞いています（もう少し自身の体を労って頂きたかったです）。。。

UCLAに個人旅行で訪問した際は、とても嬉しそうにウエストウッドやサンタモニカの街を紹介してくれました。その後私がUCLAに留学した際は、研究だけでなく、家探しなどの生活面でも助けて頂き、工藤さんにとって一番お世話をしたのが私だったのではと思います。私がUCLAに行った時には既にがん治療は終えており、放射線治療で何度か入院するのみだったと思います。私は留学中、一度だけ工藤さんと喧嘩してしまいました。「分からない事は誰かにまず聞いてみる」、そう考えていた私に、「自分で調べて自分で考える」ことを教えてくれたのが工藤さんでした。その当時何も教えてくれない工藤さんに憤りを感じ、無礼なメールを送ってしまい、その後、工藤さんが私の部屋に怒鳴り込んできました。今となっては懐かしい思い出ですが、申し訳ないことをしてしまいました。

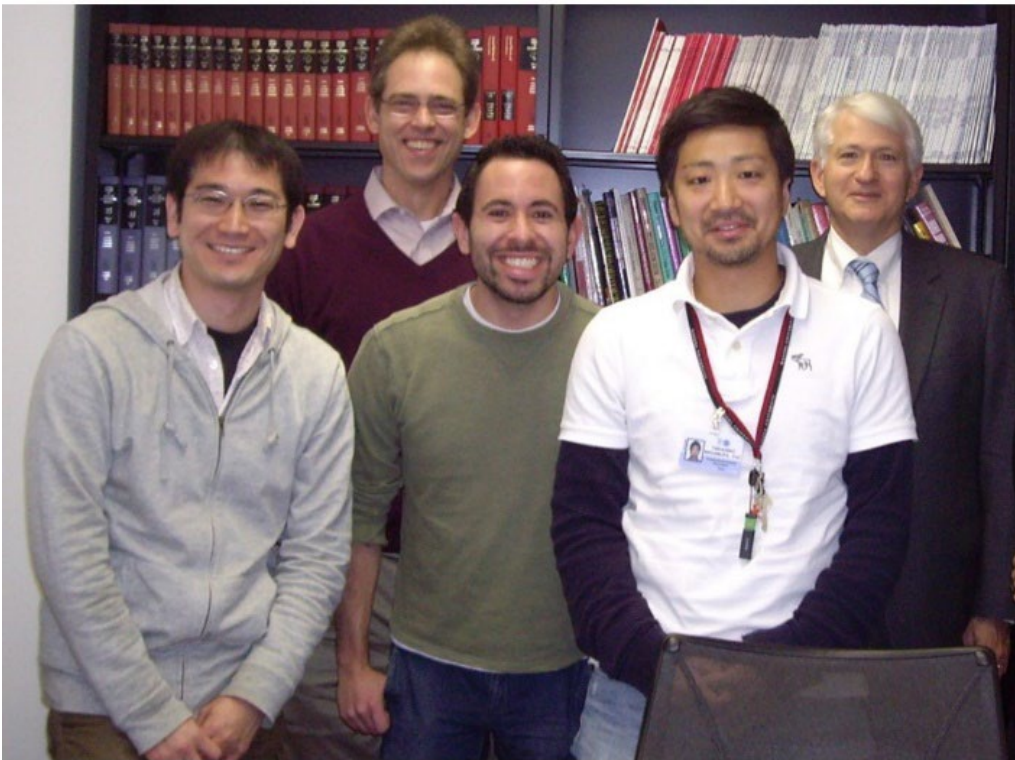
工藤さんは、UCLAで、SCNにおける新たなカリウムチャネルの役割について *The Journal of Neuroscience* 誌に報告した後⁵、神経変性疾患モデルマウスを用いた概日時計研究を展開していました。電気生理や免疫染色、行動薬理学的な手法を用いて、神経変性に伴う中枢時計の変化をきっちりと捉え、Colwellラボの新たな研究領域を切り開く大事な仕事をされました⁶。これらの研究は現在のColwellラボのメインテーマになっております。私もUCLAと一緒にいた間に、2本共著者として論文に関わらせて頂きました⁷。とにかく工藤さんは私にとって一番の柴田研の先輩であり、研究者の鏡でした。突然のお知らせで悲しい限りですが、御冥福をお祈りいたします。（田原優）

参考文献

1. 中村孝博、「アメリカ合衆国研究留学記」*時間生物学* Vol. 15 No.1 (2009).
2. Nakamura, T.J.,... **Kudo, T.** *et al.* Age-Related Changes in the Circadian System Unmasked by Constant Conditions, *eNeuro* **2**, ENEURO.0064-15 (2015).
3. Nakamura, T.J.,... **Kudo, T.** *et al.* Age-related decline in circadian output. *J Neurosci* **31**, 10201-10205 (2011).
4. Nakamura, T.J.,... **Kudo, T.** *et al.* Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids* **75**, 203-212 (2010).
5. **Kudo, T.**, Loh, D.H., Kuljis, D., Constance, C., Colwell, C.S., Fast delayed rectifier potassium current: critical for input and output of the circadian system. *J Neurosci* **31**, 2746-2755 (2011).
6. **Kudo, T.**, Loh, D.H., Truong, D., Wu, Y., Colwell, C.S. Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease, *Exp Neurol* **232**(1):66-75 (2011).
7. **Kudo, T.**, Tahara, Y., *et al.* Vasoactive intestinal peptide produces long-lasting changes in neural activity in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* **110**, 1097-1106 (2013).



ベニスビーチでの工藤氏



UCLAにて Colwell 先生(左奥)、Block 先生(右奥)と一緒にの工藤氏 (左前)



WBC2009 準決勝アメリカ戦を観戦した時。工藤氏の笑顔がとても印象的でした。

刺胞動物を用いた概日リズム・睡眠研究

金谷 啓之¹、伊藤 太一²✉

1 東京大学 大学院医学系研究科 システムズ薬理学教室、2 九州大学 基幹教育院

サンゴやクラゲ、イソギンチャクなどの刺胞動物は、動物の進化の過程で7億年以上前に他の動物と分岐した動物群である。内胚葉層と外胚葉層の二つの細胞層のみから構成される特異な体壁構造を有し、中枢のない簡素な神経系を備える。他の生物と同様、刺胞動物においても遺伝子発現レベル、および行動レベルの概日リズムが存在し、さらに近年になり、刺胞動物も睡眠様状態を示すことが報告された。刺胞動物における睡眠の分子制御機構の一端が明らかになり、ショウジョウバエやマウスとの共通性・特異性が示されている。本稿では、刺胞動物における概日リズムと睡眠の研究の現状と課題、および今後の方向性について議論する。

1. はじめに

刺胞動物は、多細胞動物の進化において、その起源に近いところで分岐した動物群である(図1)。多細胞動物の進化を議論する上で重要な系統位置にあることから、進化発生生物学等の分野で注目されている¹。同じく原始的な多細胞動物である海綿動物や平板動物が、明瞭な体軸や機能的に分化した組織を持たないのに対し、刺胞動物は口・反口方向の体軸を形成し、消化管や神経網を有する。

近年、刺胞動物の概日リズムや睡眠について、複数の報告がある。他の生物と同様、刺胞動物も時計遺伝子を有し、その行動や遺伝子発現に概日性が観察される。刺胞動物は、動物の概日リズムの進化的変遷を考

える上で、有用なモデルとなる可能性がある。概日リズムと密接に関連する睡眠は、哺乳類を含む脊椎動物に限らず、ショウジョウバエや線虫などの無脊椎動物にも存在する²⁻⁴。近年、刺胞動物であるサカサクラゲ(*Cassiopea*)⁵やヒドラ(*Hydra*)⁶も、睡眠様状態を示すことが明らかになった。中枢のない未分化な神経網を有する刺胞動物にも睡眠が存在することは、睡眠が中枢神経系で生じる現象であるとの概念を覆す。シンプルな神経系を有する動物の睡眠機構の解明により、睡眠調節機構の本質が導き出されることが期待される。本稿では、刺胞動物の特徴について概説した後、その概日リズムや睡眠の研究の現状についてまとめ、さらにその課題と今後の方向性について議論する。

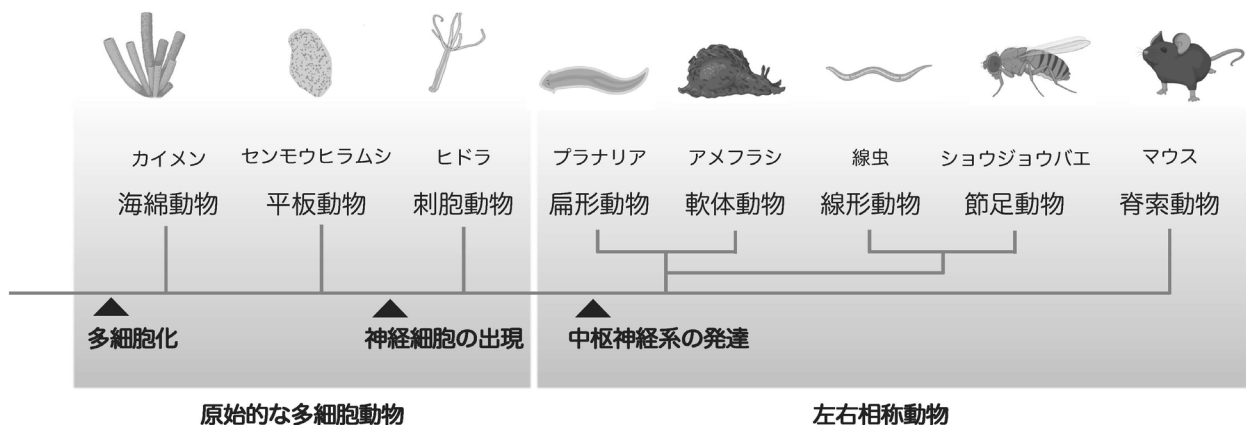


図1 多細胞動物の進化

✉ taichi.itoh@kyudai.jp

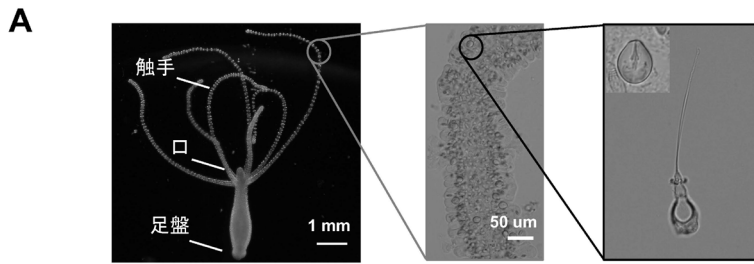
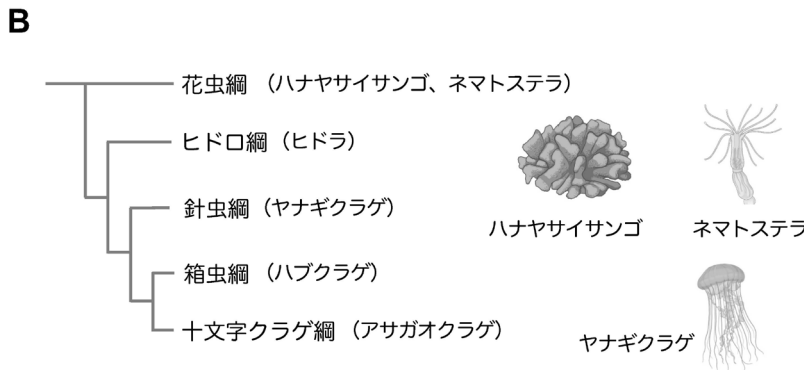


図2 刺胞動物

(A) ヒドラ(*Hydra*)の体制。触手には刺胞細胞が高密度に配置されている。刺胞は刺激に応じて発射され、突起する。

(B) 刺胞動物の系統分類。刺胞動物は5つのサブグループに分類される。



2. 刺胞動物

刺胞動物はその名の通り、「刺胞」を有する動物である。刺胞は、高度に特殊化した細胞内構造であり、一般に接触刺激に応じて発射される。刺胞動物の体には、刺胞を備えた刺胞細胞が散在している。とりわけ触手には、刺胞細胞が高密度に配置され、餌に貫通させることで捕食に役立てられる(図2A)。

刺胞動物は、これまでに記載されているものでも10,000種を超え、その生態と生活環境は実に多様である。刺胞動物は、花虫綱(Anthozoa)、ヒドロ虫綱(Hydrozoa)、鉢虫綱(Scyphozoa)、箱虫綱(Cubozoa)、十文字クラゲ綱(Staurozoa)の5つの分類群に区分される(図2B)。花虫綱はサンゴやイソギンチャクの仲間を指し、その他の分類群の動物は、一般にクラゲと呼ばれているものである。刺胞動物は、そのほとんどが海棲であり、淡水棲のものはヒドラ(図2A)をはじめとするヒドロ虫綱の動物の一部に限られる。生殖様式は様々であり、有性生殖を行う種類と無性生殖を行う種類、その両方を切り替える種類がいる。

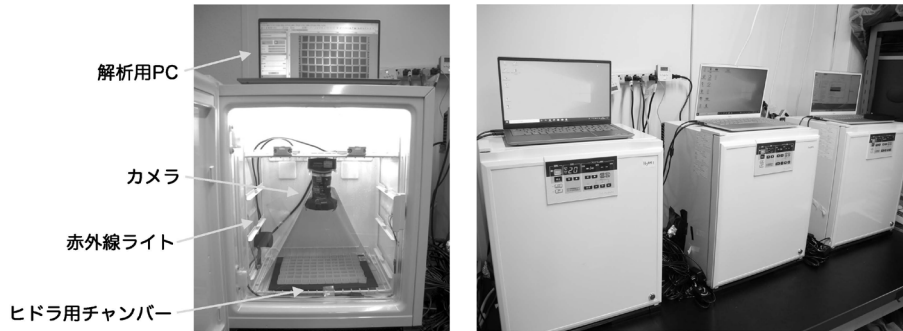
刺胞動物は、内胚葉層と外胚葉層の二つの細胞層のみから構成されるシンプルな体壁構造を持つ。さらにヒドラをはじめとする一部の刺胞動物は、体のごく一部からでも、体全身を再生させる極めて強力な再生能力を持ち、発生生物学や再生生物学のモデルとして注目されてきた⁷。またヒドラや、同じくヒドロ虫綱のベニクラゲは、不老不死の動物としても知られ、近年では老化研究の材料としても注目されている^{8,9}。

刺胞動物の特徴としてさらに特筆すべきは、中枢のない未分化な神経網を持つことである。刺胞動物の神経網は体中に一様性に分布し、例えばヒドラでは口と足盤の周囲(図2A)に若干の高密度化が見られるのみである。こうした刺胞動物の神経系は、散在神経系と呼ばれている。刺胞動物よりも、さらに進化的起源の古い海綿動物や平板動物(図1)が神経細胞を持たないことを鑑みると、刺胞動物の散在神経系は、中枢神経系が進化的に生じる以前のシステムを保持した最も原始的な神経系だと言える。近年では、ヒドラや同じくヒドロ虫綱の*Clytia*の神経細胞に、GECI(genetically encoded calcium indicator)を発現させることで、散在神経系の機能の解析が進んでいる¹⁰⁻¹²。

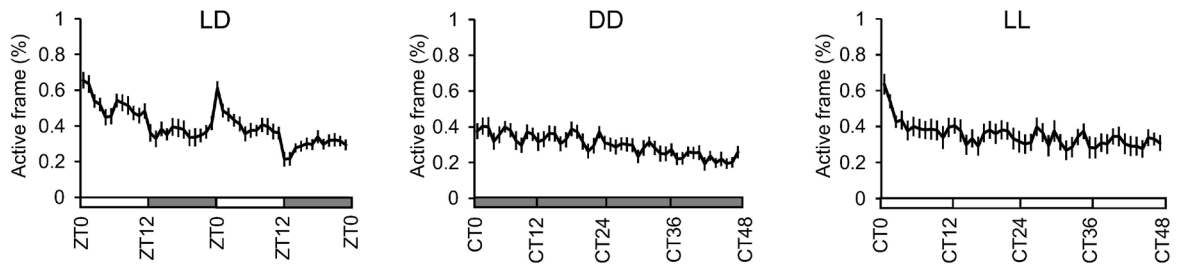
3. 刺胞動物の概日リズム

刺胞動物の概日リズムに関しては、クラゲ類の遊泳パターンや海面・海中の垂直移動等を指標に、古くから複数の報告がある^{13,14}。しかしながら、明暗サイクル下での日内変動の解析に終始しており、恒明/恒暗条件下でのフリーランリズムに関する報告はほとんど無かった。2011年に、サンゴの一種である*Acropora*の時刻依存的な遺伝子発現解析が報告され、フリーラン条件下でも発現が周期変動する遺伝子の存在が明らかになった^{15,16}。また、イソギンチャクの仲間、実験室に馴化したモデル動物であるネマトステラ(*Nematostella*)(図2B)においては、その行動のトラッキングから、恒暗条件下でも観察されるフリーランリズムが存在することが分かった^{17,18}。ネマトステ

A



B



C

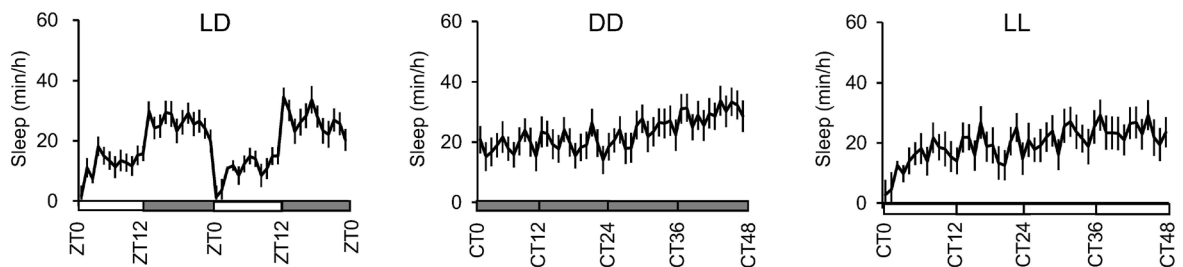


図3 ヒドラの行動の概日性と睡眠

(A) ヒドラの行動解析システム。ヒドラを小型チャンバーに入れて赤外線ライトで照らし、タイムラプス撮影を行う。ヒドラは赤外光に対し非感受性であり、疑似的な暗条件を作り出すことが可能である。明条件では、別に設けた可視光線ライトを点灯する。比較的安価な装置でセットアップ可能であり、複数の撮影システムを設けることで多個体・多条件の並列撮影が可能である。

(B) 明暗サイクル (LD)・恒暗条件 (DD)・恒明条件 (LL) におけるヒドラの行動量変化。5 秒毎に取得した画像のフレーム間差分解析により、ヒドラの動きが検出されたフレームの割合を示す。平均±標準誤差。ZT, zeitgeber time; CT, circadian time。文献 19 より改変転載。

(C) 明暗サイクル (LD)・恒暗条件 (DD)・恒明条件 (LL) におけるヒドラの睡眠パターン。平均±標準誤差。文献 6 より改変転載。

ラでは、遺伝子発現解析でも同様に、概日振動が検出された¹⁸。ネマトステラのゲノム上には、*Clock* や *Cycle/Bmal*、*Cryptochrome* の相同遺伝子が存在している。興味深いことに *Period* の相同遺伝子は存在しないが、*Clock* と *Cryptochrome* で周期的な遺伝子発現変動が見られること¹⁸、*CLOCK-CYCLE* ヘテロダイマーの形成が確認されていることから¹⁹、転写翻訳フィードバックループの存在が示唆される²⁰。

我々のグループでは、ヒドロ虫綱のヒドラの行動をハイスループットに解析するための装置を開発し、長時間にわたる行動解析を行った²¹ (図 3A)。ヒドラの行動を 5 秒毎にタイムラプス撮影し、そのフレーム

間差分を解析することで、行動を定量化するものである。解析の結果、ヒドラは明暗サイクルに応じた行動の日内変動を示すものの、恒明/恒暗条件下でのフリーランリズムは観察されなかった (図 3B)。また、ヒドラが周期的に繰り返す体の収縮に着目した解析でも、その頻度に明暗サイクルに応じた変化が観察されたが、フリーランリズムは検出されなかった。興味深いことに、ヒドラのゲノム上には、*Clock*、*Cycle/Bmal* を含めた時計遺伝子が存在しない²²。一方で、ヒドラと同じヒドロ虫綱の *Clytia* のゲノム上にはこれらの時計遺伝子が存在することから、進化の過程で、ヒドラ特異的

	サカサクラゲ	ヒドラ	線虫	ショウジョウバエ	ゼブラフィッシュ	マウス
可逆的な行動静止	+	+	+	+	+	+
反応性の低下	+	+	+	+	+	+
睡眠恒常性	+	+	+	+	+	+
概日制御	+	-	-	+	+	+
異なる睡眠相*	-	-	-	-	+	+

表 1 各動物の睡眠の特徴

*異なる睡眠相とは、レム睡眠やノンレム睡眠等の違いを指す。

に時計遺伝子の二次損失 (secondary loss) が生じたことと推定される²²。

4. 刺胞動物の睡眠

睡眠は、動物全般で広く観察される現象である。脳波 (electroencephalography, EEG) と筋電図 (electromyography EMG) の測定により定義されるノンレム睡眠とレム睡眠は、哺乳類や魚類のゼブラフィッシュなど、脊椎動物全般で観察される²³ (表 1)。また最近では、タコやクモなどの一部の無脊椎動物でもレム睡眠様状態の存在が確認されている^{24,25}。これに加え、「可逆的な行動静止」、「反応性の低下」、「睡眠恒常性」をはじめとした行動学的指標によって定義される睡眠は、ショウジョウバエや線虫等の無脊椎動物で報告されてきた²⁴ (表 1)。ショウジョウバエや線虫には行動が静止する不動状態が生じることがあり、外部からの刺激によって覚醒状態へ回復可能である (「可逆的な行動静止」)。不動状態では、覚醒状態に比べて刺激に対する反応が低下し、覚醒へ転じさせるにはより強い刺激が必要である (「反応性の低下」あるいは「覚醒閾値 (arousal threshold) の上昇」)。また、不動状態は恒常的に制御され、断眠処理をすることで、不足した分を補うようにして回復睡眠 (rebound sleep) が生じる (「睡眠恒常性」)。ショウジョウバエでは 5 分以上の不動状態が、線虫では lethargus と呼ばれる脱皮直前に示す不動状態や外界からのストレスにより引き起こされる不動状態が、睡眠に相当すると考えられている。ショウジョウバエや線虫を用いた睡眠の分子遺伝学的研究が展開され、睡眠制御の分子機構・神経機構の解明が進んできた。

2017 年に、刺胞動物鉢虫綱のサカサクラゲ (*Cassiopea*) に睡眠様状態が存在することが報告された⁵。サカサクラゲは、おおむね 1 秒間に 1 回の頻度で、傘の収縮を繰り返す。この収縮パルスの頻度に着目して解析したところ、昼間 (明期) に比べて夜間 (暗期) に収縮頻度が低下することが分かった。この収縮

頻度の低下は「反応性の低下」を伴う。さらには、収縮頻度が低下する暗期に刺激を与えて強制的にパルス頻度を上昇させると、続く明期にパルス頻度が低下し、その後回復することから、恒常性を伴う現象であることが示された。サカサクラゲのパルス頻度の変化は恒暗条件下でも観察されることから、概日制御を受けると考えられる (表 1)。

2020 年には我々のグループが、ヒドロ虫綱のヒドラの睡眠様現象を報告した⁶。先述のフレーム間差分にもとづく解析から、行動が静止する不動状態が見出され、とりわけ 20 分以上の不動が、餌や機械刺激に対する反応性の低下を伴うことから、睡眠に相当すると考えられた。機械刺激や高温処理によりヒドラの睡眠を阻害したところ、その後に回復睡眠が観察され、睡眠恒常性が確認された。ヒドラの睡眠において特徴的なのは、概日性が見られないことである。明暗サイクルに応じて睡眠量に変化するが、恒明/恒暗条件下では、一日を通じて睡眠量に大きな変化が見られなかった (図 3C) (表 1)。ヒドラの行動自体に概日性が無いことから考えると当然だが、睡眠現象と概日リズムが分離可能であると解釈することもできる。また、ヒドラに対し断眠処理を行うことで、細胞増殖が顕著に阻害された。刺胞動物においても、睡眠が動物個体の維持・成長に関与していることが示唆される。

5. 刺胞動物における睡眠の分子機構

刺胞動物は、これまでに睡眠の存在が報告された動物の中で、最も進化的起源の古い動物である。原始的で単純な神経系を有する刺胞動物の睡眠機構を解明することで、睡眠の本質が明らかになることが期待される。サカサクラゲの睡眠とヒドラの睡眠は、いずれもメラトニンの投与により促進されることが報告された^{5,6} (表 2)。メラトニンは、刺胞動物の一種であるネマトステラにおいても、光環境に応じて合成が制御されることが知られている²⁶。メラトニンを介した睡眠調節機構は、刺胞動物全般で保存されている可能性が

	サカサクラゲ	ヒドラ	線虫	ショウジョウバエ	ゼブラフィッシュ	マウス
Melatonin	●	●	●	-	●	●
GABA	-	●	●	●	●	●
Dopamine	-	●	○	○	○	○
PRKG1	-	●	●	●	-	●
Ornithine	-	○	-	●	-	-

表2 各動物の睡眠調節性分子機構の保存性

●: 睡眠促進作用, ○: 覚醒促進作用, -: これまでに報告がない/明確な作用がない.
GABA, gamma-aminobutyric acid; PRKG1, cGMP-dependent protein kinase 1.

ある。その他、ヒドラでは、GABA やドパミンの投与による睡眠長の変化が観察され、GABA 作動性・ドパミン作動性の神経システムの進化的保存性が示唆された(表2)。

また、ゲノムワイドな遺伝子発現解析により、ヒドラを6時間にわたって断眠させることで、200個強の遺伝子の発現変動が検出された。発現が変動した遺伝子には、これまでに他の動物で睡眠制御との関連が示唆されていた cGMP-dependent protein kinase 1 (PRKG1)^{4,27,28} や voltage-gated potassium channel *shaker*²⁹ の相同遺伝子が含まれていた。阻害剤を用いた実験から、他の動物で見られる PRKG1 の睡眠促進作用は、ヒドラでも保存されていることが示唆された(表2)。さらに、発現が変動した遺伝子のショウジョウバエの相同遺伝子を調べ、ショウジョウバエの神経細胞でノックダウンを行う RNAi スクリーニングを行ったところ、複数の遺伝子がショウジョウバエの睡眠調節に関わることが分かった。新たに同定された睡眠調節遺伝子の一つにオルニチンの代謝に関わる *ornithine aminotransferase (oat)* があり、*oat* を介した睡眠制御は、ショウジョウバエとヒドラの双方で共通していることが分かった。しかし興味深いことに、オルニチンが睡眠長の増減に与える影響は、ショウジョウバエとヒドラで逆であった(表2)。我々のグループは、ヒドラにおける睡眠の分子機構の探索を続けており、睡眠に影響を与える化合物のスクリーニングから、複数のヒット化合物の候補を得ることに成功している(未発表)。

6. 刺胞動物の概日リズム・睡眠研究の将来性と課題

刺胞動物は、多細胞動物の進化を考える上で重要な系統学的位置を占める。睡眠の進化的変遷・発達を探る上でも、興味深いモデルになるだろう。刺胞動物で観察される睡眠は、これまで報告されている睡眠現象の中で最も原始的であり、その起源にあたる可能性が

高い。散在神経系による睡眠制御の仕組みを明らかにすることで、睡眠研究全般に新しい洞察を与える可能性がある。

概日リズム研究においても、その生態の多様性が生かされる可能性がある。刺胞動物は一般に組織化した光受容器官を持たないが、箱虫綱の一部は、高度に発達したレンズ状の眼を備える³⁰。興味深いことに同じ箱虫綱の中でも、昼行性のクラゲと夜行性のクラゲの存在が報告されており¹⁴、高度な光受容器官を備えた刺胞動物の昼夜の認識と概日時計機構との関連の解明が期待される。また、刺胞動物の多くは、細胞内に共生藻を共生させている。相利共生として安定的な共生関係が確立され、刺胞動物が共生藻の光合成産物を受け取っている。その一方、一部の刺胞動物では、共生確立の進化途上と考えられる不安定な共生現象が観察される^{31,32}。共生・藻宿主間の概日リズムの相互作用等の解明も期待される。

刺胞動物は、このように概日リズム・睡眠の研究対象として興味深い特徴を兼ね備えているが、いくつかの課題がある。刺胞動物を用いた研究のハードルはまず、刺胞動物の多くが実験室で安定的に飼育することが難しい点である。スループットの良さが要求される概日リズム・睡眠研究を行うには、系統化され遺伝的バックグラウンドの揃ったモデル動物の安定的な供給が欠かせない。さらに、分子機構を探索するにあたっては、ゲノム情報等の整備と、遺伝学的手法へのアクセシビリティが重要である。実験室に馴化した刺胞動物で代表的なのは、ネマトステラとヒドラである。ネマトステラとヒドラのゲノムはそれぞれ、2007年と2010年に解読されている^{22,33}。遺伝学的手法に関して、ヒドラではトランスジェニック動物の作製は原理的に可能であるが³⁴、効率が良いとはいえず、複数系統を並列に作製することは難しい。また、電気穿孔法を用いたヒドラ個体への siRNA 導入による遺伝子ノックダウンも確立されているが、その操作によって個体を

大きく損傷するため、個体の行動解析は難しい。こうした遺伝学的手法の限界から、ヒドラの睡眠機構の解析は、薬理学的手法に終始してきた。一方のネマトステラは、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集により、遺伝子のノックアウト・ノックインを行うことが可能である³⁵。ネマトステラにおける睡眠様状態の報告はこれまでにないが、睡眠制御機構や概日リズム機構の遺伝学的解析を行う上での有用な実験材料となる可能性がある。また近年、ヒドロ虫綱の *Clytia* や *Hydractinia* が刺胞動物の新しい実験モデルとして確立されてきた。CRISPR ノックアウト・ノックインを行うことが可能であり、これらのモデルを採用することで分子機構の解明が飛躍的に進むことが期待される^{12,36}。

7. おわりに

近年では、ヒトやマウスを筆頭とした哺乳動物だけでなく、様々な動物での睡眠現象およびその分子機構が報告されてきている³⁷。もちろん、いわゆる「高等」動物と「下等」動物の睡眠を同じ現象として捉えることには議論の余地がある。現に、ショウジョウバエやヒドラの睡眠が sleep-like states (睡眠「様」状態) と呼ばれていることから、研究者間にその共通認識はあるだろう。ただ、その中でも刺胞動物は、その系統学的位置・単純な体制と多様な生態に他の生物とは一線を画す特徴があり、これらの強みが概日リズムや睡眠の研究に生かされる余地はあると我々は考えている。概日リズムや、特に睡眠研究では、いわゆるモデル生物を用いた研究がいまなお主流ではある。しかし、多細胞動物の進化上、神経系を初めて備えたという刺胞動物の系統上の特異性や、生態学的な多様性にあえて着目することで、概日リズム・睡眠機構の適応的意義や進化的側面が明らかになり、ひいては、その単純性からメカニズムの中核をなす本質が導き出されることが期待される。

8. 謝辞

本総説の執筆の機会を与您にいただいた糸和彦先生、池上啓介先生をはじめ、編集委員の先生方に感謝申し上げます。なお本研究の一部は、科学研究費(21H02527、22K19313)、二国間交流事業共同研究(JPJSBP120218815)、および住友財団研究助成金(200292)の支援によって行われました。なお、図の一部は BioRender (<https://biorender.com/>)を用いて作成しています。

参考文献

1. Bosch, T. C. G. *et al.* Back to the Basics: Cnidarians Start to Fire. *Trends Neurosci* **40**, 92-105 (2017).
2. Hendricks, J. C. *et al.* Rest in Drosophila is a sleep-like state. *Neuron* **25**, 129-138 (2000).
3. Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J. & Tononi, G. Correlates of sleep and waking in Drosophila melanogaster. *Science* **287**, 1834-1837 (2000).
4. Raizen, D. M. *et al.* Lethargus is a Caenorhabditis elegans sleep-like state (vol 451, pg 569, 2008). *Nature* **453**, 952-952 (2008).
5. Nath, R. D. *et al.* The Jellyfish Cassiopea Exhibits a Sleep-like State. *Curr Biol* **27**, 2984-2990, (2017).
6. Kanaya, H. J. *et al.* A sleep-like state in Hydra unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system. *Sci Adv* **6**, eabb9415 (2020).
7. Galliot, B. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), 2013).
8. Bavestrello, G., Sommer, C. & Sarà, M. Bi-directional conversion in *Turritopsis nutricula* (Hydrozoa). *Scientia Marina* **56**, 137-140 (1992).
9. Schaible, R. *et al.* Constant mortality and fertility over age in Hydra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 15701-15706 (2015).
10. Dupre, C. & Yuste, R. Non-overlapping Neural Networks in Hydra vulgaris. *Curr Biol* **27**, 1085-1097 (2017).
11. Lovas, J. R. & Yuste, R. Ensemble synchronization in the reassembly of Hydra's nervous system. *Curr Biol* **31**, 3784-3796 (2021).
12. Weissbourd, B. *et al.* A genetically tractable jellyfish model for systems and evolutionary neuroscience. *Cell* **184**, 5854-5868 (2021).
13. Mills, C. E. Vertical migration and diel activity patterns of hydromedusae: studies in a large tank. *J Plankton Res* **5**, 619-635 (1983).
14. Garm, A., Bielecki, J., Petie, R. & Nilsson, D. E. Opposite patterns of diurnal activity in the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Copula sivickisi*. *Biol Bull* **222**, 35-45 (2012).
15. Brady, A. K., Snyder, K. A. & Vize, P. D. Circadian cycles of gene expression in the coral,

- Acropora millepora. *PLoS ONE* **6**, e25072 (2011).
16. Levy, O. *et al.* Complex diel cycles of gene expression in coral-algal symbiosis. *Science* **331**, 175-175 (2011).
 17. Hendricks, W. D., Byrum, C. A. & Meyer-Bernstein, E. L. Characterization of Circadian Behavior in the Starlet Sea Anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE* **7**, e46843 (2012).
 18. Oren, M. *et al.* Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci Rep* **5**, 11418 (2015).
 19. Reitzel, A. M., Behrendt, L. & Tarrant, A. M. Light Entrained Rhythmic Gene Expression in the Sea Anemone *Nematostella vectensis*: The Evolution of the Animal Circadian Clock. *PLoS ONE* **5**, e12805 (2010).
 20. Reitzel, A. M., Tarrant, A. M. & Levy, O. Circadian Clocks in the Cnidaria: Environmental Entrainment, Molecular Regulation, and Organismal Outputs. *Integr Comp Biol* **53**, 118-130 (2013).
 21. Kanaya, H. J., Kobayakawa, Y. & Itoh, T. Q. *Hydra vulgaris* exhibits day-night variation in behavior and gene expression levels. *Zool Lett* **5**, 10 (2019).
 22. Chapman, J. A. *et al.* The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* **464**, 592-596 (2010).
 23. Leung, L. C. *et al.* Neural signatures of sleep in zebrafish. *Nature* **571**, 198-204 (2019).
 24. Medeiros, S. L. *et al.* Cyclic alternation of quiet and active sleep states in the octopus. *iScience* **24**, 102223 (2021).
 25. Rößler, D. C. *et al.* Regularly occurring bouts of retinal movements suggest an REM sleep-like state in jumping spiders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2204754119 (2022).
 26. Peres, R. *et al.* Developmental and light-entrained expression of melatonin and its relationship to the circadian clock in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Evodevo* **5**, 26 (2014).
 27. Langmesser, S. *et al.* cGMP-dependent protein kinase type I is implicated in the regulation of the timing and quality of sleep and wakefulness. *PLoS ONE* **4**, e4238 (2009).
 28. Donlea, J. *et al.* Foraging alters resilience/vulnerability to sleep disruption and starvation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2613-2618 (2012).
 29. Cirelli, C. *et al.* Reduced sleep in *Drosophila* shaker mutants. *Nature* **434**, 1087-1092 (2005).
 30. Coates, M. M. Visual Ecology and Functional Morphology of Cubozoa (Cnidaria)1. *Integr Comp Biol* **43**, 542-548 (2003).
 31. Miyokawa, R. *et al.* Horizontal Transmission of Symbiotic Green Algae Between *Hydra* Strains. *Biol Bull* **235**, 113-122 (2018).
 32. Miyokawa, R., Kanaya, H. J., Itoh, T. Q., Kobayakawa, Y. & Kusumi, J. Immature symbiotic system between horizontally transmitted green algae and brown hydra. *Sci Rep* **11**, 2921 (2021).
 33. Putnam, N. H. *et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**, 86-94 (2007).
 34. Klimovich, A., Wittlieb, J. & Bosch, T. C. G. Transgenesis in *Hydra* to characterize gene function and visualize cell behavior. *Nat Protoc* **14**, 2069-2090 (2019).
 35. Ikmi, A., McKinney, S. A., Delventhal, K. M. & Gibson, M. C. TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis*. *Nat Commun* **5**, 5486 (2014).
 36. Sanders, S. M. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene knockin in the hydroid *Hydractinia symbiolongicarpus*. *BMC Genomics* **19**, 649 (2018).
 37. Pennisi, E. The simplest of slumbers. *Science* **374**, 526-529 (2021).

時計細胞集団の同期状態に着目した 位相応答曲線の効率的な測定方法

福田 弘和¹✉、増田 巨作^{2,3}

1 大阪公立大学大学院 工学研究科 機械工学分野、2 筑波大学 医学医療系、

3 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

概日時計が環境サイクルに同期するプロセスを解き明かすためには、光や温度などの様々な同調因子に対する概日時計の位相応答曲線 (phase response curve (PRC)) を求める必要がある。しかしながら、PRC の測定には手間がかかるため、様々な同調因子に対する PRC を網羅的に解析することは困難とされてきた。また、得られた PRC のデータ点は個体差によるノイズを含むことが多く、しかも、データ数がそもそも不十分であり PRC が正確に求まらないことも多い。そこで本稿では、まず、概日時計の内部状態 (細胞集団の同期状態) に応じて PRC がどのように変化するかを説明し、その特徴に着目することで PRC をより正確に求める方法を紹介する。そして、データ数を効率よく増やす方法や、1 回の実験だけで PRC を推定できる方法を紹介する。これらの方法は、PRC 測定の高精度化と高効率化に役立つだけでなく、概日時計が時計細胞集団としてどのような位相応答を経て環境サイクルに同期しているかを理解することにも役立つ。

1. はじめに

概日時計は光や温度などの入力に対して、位相シフトを示す。ただし、位相シフトの量は入力時における概日時計の位相に依存する。入力時の様々な位相に対する位相シフト量をプロットした曲線を位相応答曲線 (PRC) という¹。PRC の形状から入力の強さや概日時計の引き込み特性を知ることができる。位相応答がプラス (位相前進) からマイナス (位相後退) に変わる点は「安定点」と呼ばれ、この前後に刺激が加わった場合、リズムの位相は安定点に向かってシフトする。そのため、入力が周期的である場合は、安定点は概日リズムが引き込まれる位相を示す。また、位相応答がマイナスからプラスに変わる点は「不安定点」と呼ばれ、安定点とは逆に不安定点付近での刺激は不安定点から離れるように位相を変化させる。PRC の曲線の振幅が、比較的小さく連続的に繋がったものは「1 型」の PRC と呼ばれる (図 1A)。一方で、位相シフト量が大きく、PRC の曲線が上下でつながり、グラフとしては不連続に見えるものは「0 型」と呼ばれる (図 1B)。1 型と 0 型は、刺激前の位相に対し

て刺激後の位相をプロットした位相移行 (遷移) 曲線 (phase transition curve) の傾きが 1 であるか 0 であるかで判断できる¹ (Winfree のテキストでは、刺激前後の旧位相と新位相を表現するトラスに対して PRC のプロットを繋げた線の巻き数 (0 型は 0 回巻く (巻かない)、1 型は 1 回巻く) と定義されている²)。特に 0 型の PRC では、不連続となる位相 (不安定点) の直前と直後で、それぞれ -12 時間と +12 時間もの位相シフトが生じ得る。これにより、逆位相にある安定点に位相がリセットされることになる。PRC が 0 型を示す入力は、概日時計を 1 回の入力だけでリセットさせるほどの力がある。さらに、PRC により、概日時計の環境サイクルへの同期プロセスを正確に予測できるだけでなく、複雑な入力下における生物内部の細胞集団の同期状態も予測できる^{3,4}。このため、PRC は概日時計の状態を予測し制御する上で重要である。

しかしながら、PRC を求めるためには、面倒で時間のかかる実験が必要である。これまでの一般的な方法では、複数の個体や細胞を用意し、それぞれ概日時

✉ fukuda@omu.ac.jp

計の異なる位相に一つ一つパルス入力を与え、それぞれに対する位相シフト量を測定する必要があった^{1,5,7}。しかし、得られた PRC は個体差によるノイズを含むことが多く、実験で得られるデータ数がそもそも不十分であり PRC が正確に求まらないことも多かった。このため、少ないデータ数から PRC をうまく推定する解析手法の研究も行われてきた⁶。このように、測定が容易でなかったため、入力の種類や強度の違いによる PRC の比較など PRC の詳細を解析した研究は思ったより少なかった。

本稿では、「細胞集団における位相応答」の特性を利用した効率的な PRC の同定法を紹介する。本手法は細胞集団の同期状態と位相応答の関係性に基づいているため、実験には植物シロイヌナズナを用いているが、細胞間の同期状態が変化する系であれば他の生物種でも応用できると期待できる。本稿では、細胞間の結合について考慮しないが、パルスの刺激に対して位相応答は瞬時的に作用すると考えるので、結合の有無や様式の違いに依らず同様の議論が成り立つと考えられる。

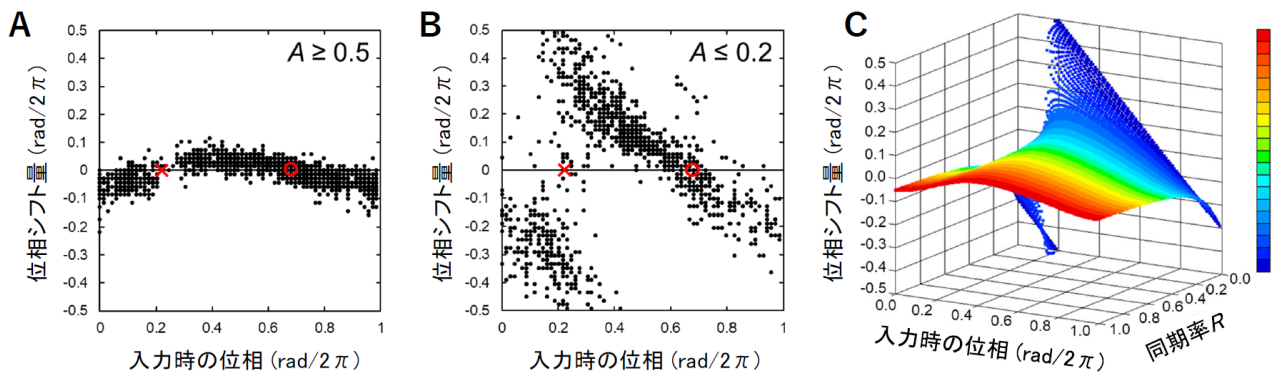


図1 概日リズムの振幅に対する PRC の変化。

(A,B) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、2 時間幅の暗期パルスを与えたときの PRC。A は概日リズムの振幅が高い時における PRC ($A \geq 0.5$)、B は振幅が低い時における PRC ($A \leq 0.2$) である。○印と×印はそれぞれ PRC における安定点と不安定点を示している。

(C) 振動子集団の数理モデルを用いた PRC の解析解。R は振動子集団の同期率を表す。文献¹³を改変。

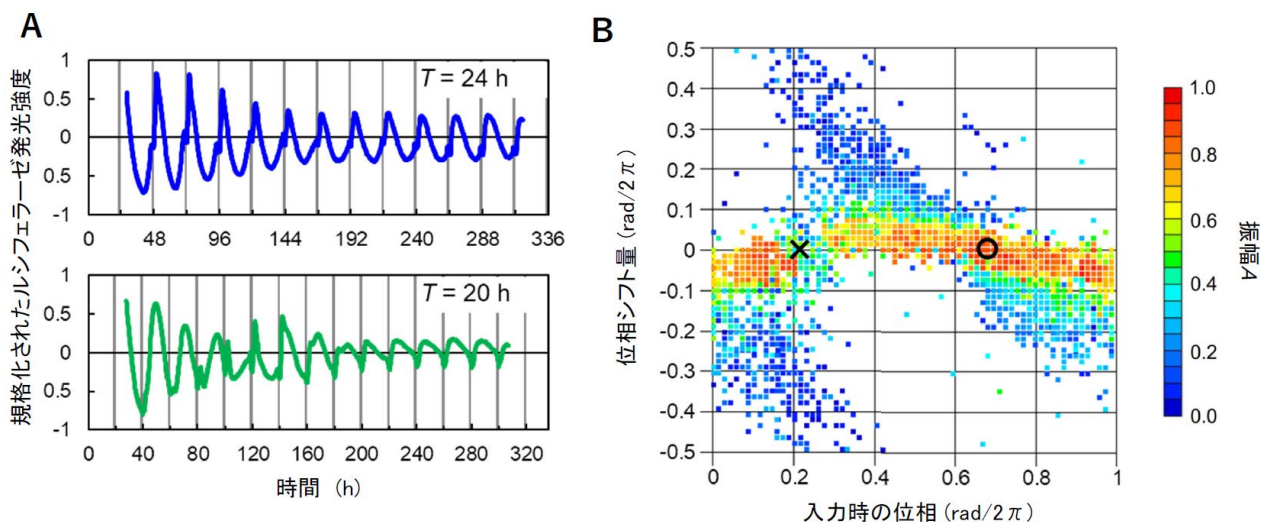


図2 周期的パルス入力による PRC の同定。

(A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、2 時間幅の暗期パルスを周期的に複数回与えた場合の概日リズム。24 時間の周期で与えた場合 (上図) と 20 時間の周期で与えた場合 (下図)。

(B) 周期的パルス入力により得られた PRC。パルス入力の周期を 12 種類 (16 時間から 32 時間まで) 用い、周期毎に約 40 個体のサンプルを用いた。入力時の概日リズムの振幅 A で色分けして PRC を表示した。文献¹³を改変。

2. 細胞リズムと個体リズムの PRC

個体などの細胞集団における概日リズム（以降、個体リズムと呼ぶ）は、個々の細胞の概日リズム（以降、細胞リズムと呼ぶ）の総和として理解できる⁸⁻¹²。このため、細胞集団が同期していれば個体リズムの振幅は大きくなるが、同期していなければ振幅は小さくなる。直感的にも振幅によって応答性が変わると思われるが¹、果たして PRC はどのように変化するであろうか？ 以降、個体レベルの PRC と細胞レベルの PRC を区別して議論するので、それぞれ「iPRC」と「cPRC」と記すことにする。なお、単に「PRC」と記した場合は、両方に当てはまることを意味する。

図 1 は、シロイヌナズナにパルス入力（2 時間幅の暗期パルス）を与えた時の iPRC である¹³。概日リズムの振幅が大きい場合、1 型の iPRC が観察される（図 1A）。一方で、概日リズムの振幅が小さい場合、0 型の iPRC が観察される（図 1B）。興味深いことに、iPRC を特徴付ける安定点（○印）と不安定点（×印）の位置は、両者で同じである。しかし、不安定点（×印）の近傍で、位相シフト量に大きな違いが生じている（図 1B）。

この iPRC の個体リズムの振幅に対する依存性は、理論的に求めることができる¹³。前提として、集団を構成する細胞が同期している状態では、個々のリズムが同じ位相で重なり合うことで個体リズムの振幅は大きくなる。一方で、脱同期状態では個々のリズムが打ち消しあうことにより個体リズムの振幅は小さくなる。そのため、個体リズムの振幅は、細胞集団の同期率を反映していると考えられる。同期率は、各細胞 ($j = 1, 2, \dots, N$) の位相 ϕ_j を単位円上にプロットした点集団の分布を考えることで上手く数値化できる。同期率として、秩序パラメータと呼ばれる点集団の重心ベクトルの長さ $R (= (1/N) |\sum_{j=1}^N \exp(i\phi_j)|)$ を用いることが多い³。図 1C は理論で求めた解析解のグラフである。完全な同期状態 ($R = 1$) では、全ての細胞が同じ応答をするので iPRC は cPRC と同じになる。また、高～中程度の同期状態でも ($R \geq 0.5$)、iPRC は cPRC とほとんど同じである。しかし、同期状態が 0.4 を下回ると、不安定点（×印）を中心にして iPRC は上下に引き裂かれ、振れ幅が大きくなる。そして、十分に低い同期状態となると ($R \leq 0.2$)、傾き -1 の iPRC に到達する。傾き -1 の iPRC は、入力時の位相がどこであっても必ず安定点（○印）の位相にジャンプすることを意味する。つまり、どのタイミングで刺激を受けても必ず安定点の位相に個体リズムがリセットされる。

iPRC の 1 型から 0 型への遷移は、理論的には以下のように理解することができる。上述の通り、すべての細胞が同期状態のとき ($R = 1$)、iPRC は cPRC と等しい。したがって、cPRC が 1 型の PRC であるとき、iPRC も 1 型となる。一方、細胞の位相が一律に分布し完全な脱同期状態にあるとき ($R = 0$)、個体リズムの応答は“すべての位相”に対する細胞リズムの応答を平均したリズムとして現れる。このため、個体リズムは刺激を与えるタイミングによらず常に同じ位相にリセットされることから、iPRC は 0 型となる。この際、個々の細胞は cPRC の安定点の位相に引き寄せられることから、その総合である個体リズムは cPRC の安定点の位相にリセットされる。これらの中間の状態では、細胞集団内で同期した細胞と脱同期状態の細胞が混ざり合った状態となるため、それらの割合が変化するに応じて iPRC が 1 型から 0 型へと遷移する。したがって、よく同期した高振幅での iPRC (\equiv cPRC) を得ることができれば、それを元に低振幅での iPRC は理論を用いて解析的に求めることができる¹³。

なお、振幅と PRC の型の間に関係があることは、Winfree の指摘以来多くの時間生物学者が認識している。PRC の振幅依存性に関する伝統的な考え方は、振幅の低下にともない相対的な刺激の強さが大きくなり、リミットサイクルの特異点を越えることで PRC が 1 型から 0 型へ遷移する^{1,8,14}。この変化において、安定点の位相は常に一定であり、特に不安定点の近傍で位相応答量の変化が大きい。このように、細胞集団の iPRC の変化は、伝統的なリミットサイクルを用いたモデルにおける PRC の変化と非常に類似している。

3. 周期的パルス入力による PRC 同定法

上述のように、iPRC は 3 次元空間 ($\phi, \Delta\phi, R$ 空間) における曲面で表される。したがって、“曲面”を描くためには“曲線”を描くよりもさらに多くのデータ点が必要であり、実験の効率化が求められる。

図 2 は、同じ個体にパルス入力を周期的に複数回与えた場合の実験結果である。概日リズムは振幅を徐々に変化させながら、各パルスに対して位相応答する（図 2A）。パルス毎に入力時の位相と振幅、そして入力後の位相シフト量を算出すると、パルス入力の回数分のデータを得ることができる。一度に複数のデータ点を得ることができるので、1 個体から 1 つの位相シフト量を計測する一般的な PRC 計測方法⁵と比較すると、iPRC の同定効率が 10 倍ほど向上する。

この手法は複数のパルスを用いることから、multiple pulses-PRC 法 (MP-PRC 法) と呼ぶ。なお、これまでも連続パルスを用いて PRC を計測する方法はあったが、リズムの振幅の変化については考慮されていなかった¹⁵。

MP-PRC 法では、刺激前後のリズムのピークの位置から位相と位相応答を求める。位相は刺激前のピークから刺激までの時間から求め、位相応答は刺激を跨いだピークからピークまでの間の時間と自然周期の差から求めることができる。リズムのトラフも用いられれば、ピークからでは位相を求めづらいピーク前後の刺激に対する計算も補うことができる。さらに、入力時の位相と振幅をさまざま変化させるためには、パルス入力の周期を例えば 16 時間から 32 時間まで変化させるとよい。周期が変わることで同期に至るまでの位相や振幅(同期率)が複雑に変化する(図 2A 下段)。刺激により波形が変わってしまうなど、ピークやトラフが読み取りづらい場合は刺激の周期を長めに取ると良い。

図 2B は、MP-PRC 法によって得られた iPRC である。パルス入力の周期を 12 種類 (16 時間から 32 時間まで) 用い、周期毎に約 40 個体のサンプルを用いた。合計約 500 個のデータ点を入力時の振幅でソートすることで、理論で求めた解析解 (図 1C) と同等の iPRC が得られている。

よく同期した高振幅での iPRC (≒cPRC) を得ることができれば、それを元に低振幅での iPRC は解析的に推定することができる。しかし、3 次元的な iPRC を“実測”したい場合は、MP-PRC 法は有力な方法となる。例えば、iPRC に対するノイズの大きさ (低振幅の不安定点付近では特にノイズが大きい) は解析モデルだけでは推定できず、また、高振幅状態で iPRC を正しく計測できているかを確認するには振幅による iPRC の変化を確認するのが確実であるため、MP-PRC 法による実測が役立つ。

4. シンギュラリティ応答による PRC 推定法

個体リズムから「細胞レベルの cPRC」をたった 1 度のパルス入力でも推定できる手法を紹介する。細胞集団が脱同期し、個体リズムの振幅がゼロ (もしくは微小) となった状態を「シンギュラリティ」と呼ぶ^{8,10,14}。シンギュラリティにパルス入力を与えた場合、個々の細胞リズムは「cPRC」に従って安定点の位相に向かって位相シフトするので、それらを総合した個体リズムには cPRC を反映した変化が見られると期待できる。

シロイヌナズナでは、恒常条件で概日リズムが減衰するので、容易にシンギュラリティとなった個体を得ることができる。図 3A はシンギュラリティにおける個体リズムの変化である¹⁶。個体ごとのリズムは時間とともに減衰し、刺激直前では振幅が小さくバラバラの位相を示している。一方で、入力後のリズムは、2 時間の暗期パルスという比較的弱い刺激に対しても、ほとんどの個体と同じ位相と振幅にリセットされている (図 3B、C)。これをシンギュラリティ応答 (singularity response (SR)) と呼ぶ。SR では同じ刺激に対しては常に同じ応答を示すため、入力後の位相 (Θ') と振幅 (R') を特徴量として得ることで、これらの特徴量から cPRC を推定することができる。定性的には、 Θ' が cPRC の安定点の位相、 R' が cPRC の振れ幅に対応していると理解できる。ただし、cPRC の波形はパルス入力の継続時間 (Δt) によって変化する。

cPRC の推定には、次の細胞集団の位相振動子モデルを用いる。

$$\frac{d\phi_j}{dt} = \omega_j + a \sin(\phi_j - \alpha) E(t) \quad (1)$$

ここで、 ϕ_j と ω_j はそれぞれ細胞 j ($j = 1, 2, \dots, N$) の位相と自然振動数、 $E(t)$ は外力であり、入力時は $E(t) = 1$ である。 $a \sin(\phi_j - \alpha)$ は位相感受性と呼ばれる。係数 a と α は入力の強さや種類によって変わるが、 a と α が決まれば、cPRC の形が決まる。また、このモデル式では振動子の数を 1000 個ほど用いることで、集団の脱同期状態の平均リズムによって SR を再現できる。つまり、 (a, α) と (Θ', R') の関係は式(1)の数値シミュレーションにより得ることができる。したがって、SR で得られた (Θ', R') から (a, α) を求め、 (a, α) から cPRC を求めることができる。この SR を用いた PRC 推定法を singularity response-PRC 法 (SR-PRC 法) と呼ぶ。

図 3D は 2 時間幅の暗期パルスに対する高振幅状態での iPRC (≒cPRC) と SR-PRC 法によって推定された cPRC を示す。推定された cPRC が実測された cPRC の振幅や安定点の位相をよく再現できていることがわかる。また、SR-PRC 法は、概日リズムが大きく変性する時計変異株の PRC の推定にも利用可能である。シロイヌナズナの野生株は暗期パルスに対して 1 型の PRC を示すが (図 3D)、変異株 *prr7* では 0 型の PRC を示す (図 3E)。SR-PRC 法はこれらの PRC の違いを正しく推定できている。この他、SR-PRC 法は高温刺激パルス、低温刺激パルス、青色光パルスなどに対する PRC も推定することができる¹⁶。

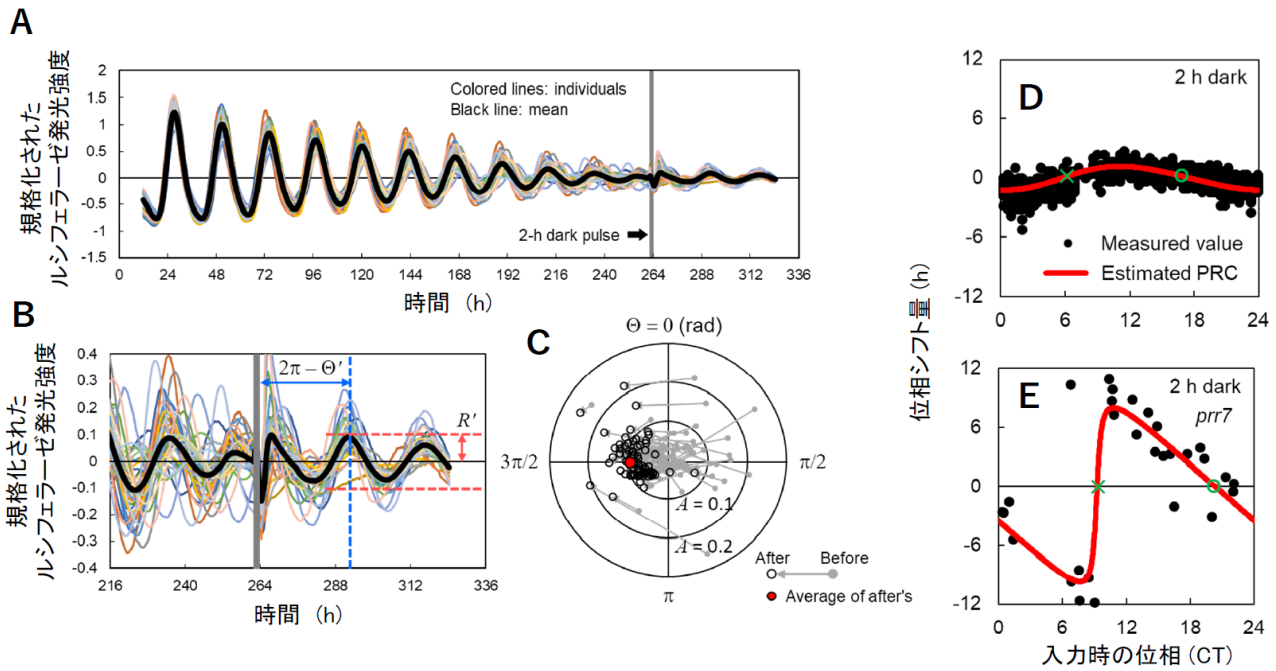


図3 シングularity応答によるPRCの推定。

- (A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、 $t = 262$ h に 2 時間幅の暗期パルスを与えた。
- (B) シングularity応答の拡大図。カラー線と黒色線はそれぞれ各個体の概日リズムと平均値。
- (C) 入力の前後における位相と振幅の関係。
- (D) 2 時間幅の暗期パルスに対する野生株の PRC。赤色の曲線は SR-PRC 法で推定した PRC。
- (E) 2 時間幅の暗期パルスに対する時計変異株 (*prr7*) の PRC。赤色の曲線は SR-PRC 法で推定した PRC。○印と×印はそれぞれ PRC における安定点と不安定点を示している。文献¹⁶を改変。

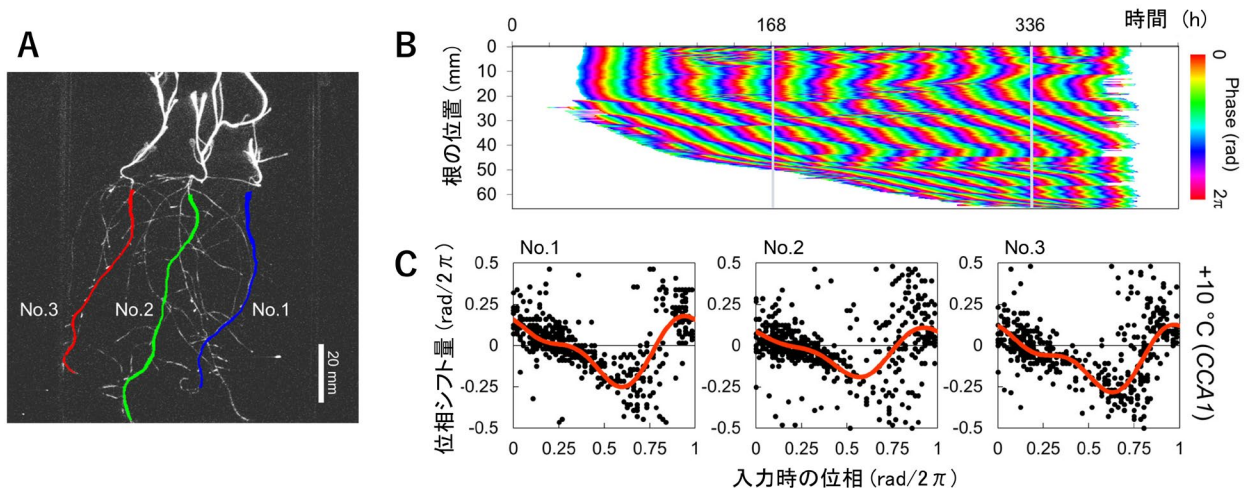


図4 時空間パターン（ストライプ波）を用いた PRC の同定。

- (A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を垂直に立てた培地を用いて連続暗条件下で栽培し、ルシフェラーゼ発光を撮影した時の様子。3つの個体の主根の位置を青緑赤色で示した。
- (B) 個体 No.1 の主根における概日リズムの位相の時空プロット。温度パルス（30 分間 10°C 上昇（22°C→32°C））を $t = 168$ h と 336 h に与えた。
- (C) 温度パルスに対する各個体の PRC。赤色の曲線はデータ点に対するフィッティング曲線。文献²³を改変。

SR-PRC 法は、cPRC をたった 1 度のパルス入力で推定できる手法であり、非常に効率的な PRC 同定法である。この手法では一つ一つの個体から PRC のパラメータ（位相と振幅）を求めることができるため、

複数の個体から一つの PRC を求める従来手法と比べて、定量的な評価や統計的な比較も容易である。利用時における注意点として、元々の細胞リズムの振幅が小さい場合は実際の同期率より個体リズムの振幅が

小さくなるなど、振幅と同期率の関係が実験により異なるため、少なくとも1つのPRCを実測することで、理論と実験の値の差を補正する必要がある¹⁶。また、精度を上げるためには十分な脱同期状態(シンギュラリティ)を生じさせる必要がある。もちろん、サンプル数を十分に増やせば平均することで正確さを上げることができるが(図3C)、各サンプルを十分かつ効率的に脱同期することができれば実験効率が向上する。さらに、この手法は式(1)のようなシンプルなモデルを仮定しているため、PRC自体が高調波成分を含むなど複雑な波形の場合は、SR-PRC法では推定ができないので注意が必要である。

5. 時空間パターンを用いたPRC同定法

一度に多くの位相応答データを得る方法として、細胞集団のイメージングはとても有効である^{7,17,18}。もし、入力時に細胞集団の位相が十分に脱同期していたとすれば、一回の観察だけでPRCを得ることができる。ただし、細胞集団を脱同期させるには工夫が必要である。

細胞集団を脱同期させる方法として、空間的に光などの環境を制御することにより細胞ごとに異なる刺激を与え、異なる位相にリセットする方法がある。あるいは、恒常条件下に生物において自発的な脱同期をじっくり待つ方法もある(例えば図3A)。後者の方法は、植物の根においては実は非常に相性が良い。根は恒常条件下でも細胞増殖と成長を続けるが、成長点近傍の伸張・分化領域の細胞群にだけ組織特異的な概日時計の位相リセットが生じる¹⁹⁻²²。この位相リセットにより、新たに生まれた細胞群と既にある細胞群とで位相のズレが生じ、これが蓄積して全体として脱同期を示す。この脱同期は、時計遺伝子の発現量をルシフェラーゼ発光でイメージングすると縞状の位相波(ストライプ波)として観察される。

また、植物の根は厚みの薄い培地では2次元的に広がり、ほとんど動くことがない。このため、撮影だけでなくデータ解析も容易に行える。図4Aは3つのシロイヌナズナを連続暗条件で栽培し、時計遺伝子*CCA1*の発現をルシフェラーゼ発光で観察したものである²³。根同士が複雑に交差しているが、動画を再生し成長の様子を見れば主根や側根を分離できる。図4Bは主根における概日リズムの位相を示している。例えば $t = 168$ hを見ると、根の先端部で位相が縞状に密に変化していることが分かる。このように、連続暗条件で栽培しただけで十分に脱同期した細胞集団を得ることができる。

図4Bでは、 $t = 168$ hと336 hに温度を30分間10°C上昇させるパルス入力を与えた。入力の前後における位相変化から位相シフト量を算出しPRCを求めた。図4Cは、3つの個体(No. 1, 2, 3)におけるPRCを示している。それぞれ各個体から得たPRCであるが、全ての位相での位相応答がきちんと計測できている。また、3つのPRCはおおよそ同じ波形を描いており、高い再現性が認められる。1回だけの計測で、同時に3個体分のPRCを得ることができており、大変効率のよいPRC同定法である。

時空間パターンを用いたPRC測定法(Pattern-PRC法)は、1個体だけを用いた1回の実験でPRCを“実測”できるという強みがある。このため、PRCの個体差や、個体内部のPRCの応答ノイズも定量化でき、概日時計のノイズな振る舞いを解明するための基礎データを与えてくれる。

6. おわりに

個体(細胞集団)レベルの位相応答は細胞集団の同期率 R に大きく依存する。そのため、同期率 R やそれを反映した振幅 A でデータをソートしていないと、iPRCが乱雑に広がってノイズに見えてしまう。同期率 R や振幅 A でデータをソートすることは、iPRCの正確さを向上させるために必須と言える。あるいは、高振幅状態で計測することを意識することで高振幅状態のiPRC(≒cPRC)を求めることが重要である。

細胞レベルと個体レベルのPRCの関係をまとめると次の通りとなる。

- ① 高い振幅に対する位相応答データだけを用いることでcPRCを求めることができる。
- ② cPRCが分かれば、iPRCは理論的に推定できる。

この知見により、3次元空間($\phi, \Delta\phi, R$ 空間)における曲面として表されるiPRCを、少ない実験量で効率よく求めることができる。

例えば、効率を重視するのであれば、SR-PRC法によりcPRCを推定し、それを元にiPRCを理論的に推定すればよい(②)。これにより、1個体に1回のパルス入力を与えるだけで3次元的なiPRC曲面を得ることができる。一方で、応答ノイズも含めてPRCを実測したいのであれば、Pattern-PRC法を用いるのがよい。しかし、時空間パターンが生じにくい場合やイメージングできない場合は、MP-PRC法を用いる。ここで重要なのは、高振幅でのiPRCはcPRCであることを意識しながら、位相応答のデータを振幅 A

でソートすることで見かけ上のノイズをしっかりと落としておくことである (①)。

冒頭に述べたように、PRC は概日時計の状態を予測し制御する上で重要である。様々な入力に対する PRC が得られると、複雑な環境における概日時計の振る舞いを精度よく予測でき、入力をデザインすることで概日時計を様々な状態に制御することができる⁴。本稿で紹介した効率的な PRC 同定法が、さまざまな生物種で概日時計の状態予測や制御の研究にも役に立てば幸いである。

参考文献

1. Johnson, C. H. Forty years of PRCs – What have we learned? *Chronobiol. Int.* **16**, 711-743 (1999).
PRC の例は歴史的なものを含めて Johnson C. H. ラボから公開されているので参照されたい (<https://as.vanderbilt.edu/johnsonlab/prcatlas/>)。
2. Winfree, A. T. 著 (鈴木善次, 鈴木良次訳). 生物時計. pp. 55-67, 東京化学同人 (1992).
3. Fukuda, H., Murase, H., & Tokuda, I. T. Controlling circadian rhythms by dark-pulse perturbations in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **3**, 1533 (2013).
4. Masuda, K., Yamada, T., Kagawa, Y., & Fukuda, H. Time lag between light and heat diurnal cycles modulates *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATION 1* rhythm and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **11**, 614360 (2021).
5. Fukuda, H., Uchida, Y., & Nakamichi, N. Effect of dark pulse under continuous red light on the *Arabidopsis thaliana* circadian rhythm. *Environ. Control. Biol.* **46**, 123–128 (2008).
6. Ohara, T., Fukuda, H., & Tokuda, I. T. Phase response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to light pulses of different wavelengths. *J. Biol. Rhythms* **30**, 95-103 (2015).
7. Manella, G., Aizik, D., Aviram, R., Golik, M., & Asher, G. Circa-SCOPE: high-throughput live single-cell imaging method for analysis of circadian clock resetting. *Nat. Commun.* **12**, 5903 (2021).
8. Winfree, A. T. The Geometry of biological time. pp. 530, Springer-Verlag New York (1980).
9. Millar, A. J., Carre, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H., & Kay, S. A. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**, 1161-1163 (1995).
10. Ukai, H. et al. Melanopsin-dependent photoperturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1327-1334 (2007).
11. Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M. A., Araki, T., & Kay, S. A. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* **515**, 419-422 (2014).
12. Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K., & Mas, P. A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* **163**, 148-159 (2015).
13. Masuda, K., Kitaoka, R., Ukai, K., Tokuda, I. T., & Fukuda, H. Multicellularity enriches the entrainment of *Arabidopsis* circadian clock. *Sci. Adv.* **3**, e1700808 (2017).
14. Koinuma, S., Kori, H., Tokuda, I. T., Yagita, K., & Shigeyoshi, Y. Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells. *PLoS ONE* **12**, e0181223 (2017).
15. 石田 直理雄, 本間 研一(編). 時間生物学事典. pp. 44-45, 朝倉書店 (2008).
16. Masuda, K., Tokuda, I. T., Nakamichi, N., & Fukuda, H. The singularity response reveals entrainment properties of the plant circadian clock. *Nat. Commun.* **12**, 864 (2021).
17. Wenden, B., Toner, D. L. K., Hodge, S. K., Grima, R., & Millar, A. J. Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6757-6762 (2012).
18. Muranaka, T., & Oyama, T. Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci. Adv.* **2**, e1600500 (2016).
19. Fukuda, H., Ukai, K., & Oyama, T. Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase resetting in plant roots. *Phys. Rev. E* **86**, 041917 (2012).

20. Ukai, K. et al. Traveling waves of circadian gene expression in lettuce. *Environ. Control. Biol.* **50**, 237-246 (2012).
21. Voß, U. et al. The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* **6**, 7641 (2015).
22. Greenwood, M., Domijan, M., Gould, P. D., Hall, A. J. W., & Locke, J. C. W. Coordinated circadian timing through the integration of local inputs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **17**, e3000407 (2019).
23. Masuda, K., & Fukuda, H. Unstable phase response curves shown by spatiotemporal patterns in the plant root circadian clock. *J. Biol. Rhythms* **36**, 432-441 (2021).



位相応答曲線の数理解析

瓜生 耕一郎[✉]

金沢大学 理工研究域 生命理工学系

概日時計が明暗サイクルに同調するメカニズムの一つは、受容した光シグナルに応じてその位相を前進および後退させることである。光シグナルが概日時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループや、リン酸化などで制御されるタンパク質の活性状態に作用することで細胞レベルの位相変化が起き、多細胞生物の場合にはさらに組織および個体レベルでの位相変化が起きる。概日時計の位相応答能を調べるのに一般的に用いられるのは、恒暗条件下において短時間の光パルスを生物に投与することで得られる位相応答曲線 (PRC) である。本稿では PRC の形状に関する数理研究を紹介し、細胞内の遺伝子制御や生化学反応が PRC に及ぼす影響について議論する。初めに、複数の生物種の PRC の特徴である位相不応期 (dead zone) が、転写翻訳フィードバックループ内の飽和型の生化学反応によって形成されることを示す。次に、哺乳類の概日時計遺伝子 *Period1/2* の位相応答における役割分担について紹介する。

1. はじめに

地球上の多くの生物は、生体内の概日時計により約 24 時間周期の生理活性および行動リズムを示す。概日時計は、細胞内の遺伝子発現リズム、もしくはリン酸化状態などによって変化するタンパク質活性リズムによって構成される。発振メカニズムは、多くの生物において時計遺伝子産物のネガティブフィードバックループ (negative feedback loop; NFL) である (図 1A, B)。哺乳類では、CLOCK/BMAL1 タンパク質複合体が E-box 配列に結合することにより *Period* (*Per*) 遺伝子や *Cryptochrome* (*Cry*) 遺伝子の転写を誘導する (図 1A)。翻訳された PER と CRY は複合体を形成し、CLOCK/BMAL1 に結合することで自身の転写を抑制する。mRNA からタンパク質が合成され、複合体が転写を抑制するまでには時間がかかるため、この間に *Per* と *Cry*mRNA は十分増えることができる。増加した *Per*, *Cry*mRNA からは多くのタンパク質が合成され、タンパク質が分解されてなくなるまでの長い時間、自身の転写を抑制する。PER/CRY タンパク質がなくなると転写が再開し、この繰り返しによりリズムが生じる。ショウジョウバエでは、CLOCK/CYCLE 複合体が *timeless* (*tim*) および *per* のプロモーターに存在する E-box に結合することでこれらの遺伝子の転写を誘導する (図 1B)。TIM/PER 複合体は CLOCK/CYCLE に結合し、自身

の転写を抑制することでフィードバックループを閉じる。

概日時計の重要な性質として、明暗サイクルに対する同調能が挙げられる。様々な生物において恒常暗での概日時計の周期 (フリーラン周期) は、24 時間とはわずかに異なる。受容された光シグナルは時計遺伝子産物の発現および活性を変化させ、時刻依存的に概日時計を進めたり遅らせたりすることで概日時計の周期を明暗サイクルの周期に一致させる。光シグナルの入力によって起きる NFL 内の生化学反応は生物種によって異なる。例えば、哺乳類の場合、網膜で受容された光シグナルは時計中枢である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に伝わり、神経細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させる。それによりさまざまなリン酸化酵素が活性化され、CREB のリン酸化が起きる。リン酸化 CREB は *Per* 遺伝子の発現を一過的に誘導する (図 1A)^{1,2}。ショウジョウバエの場合、光シグナルにより CRY タンパク質が活性化され、TIM タンパク質の分解を促進する (図 1B)³⁻⁶。光シグナルにより細胞内の時計タンパク質の濃度が増減することで、概日時計の進み方が変化する。時計中枢の情報は末梢組織へと伝達され、各組織における概日時計の変化を導き⁷、時計中枢と末梢組織の両方のリズムの周期が明暗サイクルの周期に一致する。このように、光シグナルが NFL の生化学反応に影響

✉ uriu@staff.kanazawa-u.ac.jp

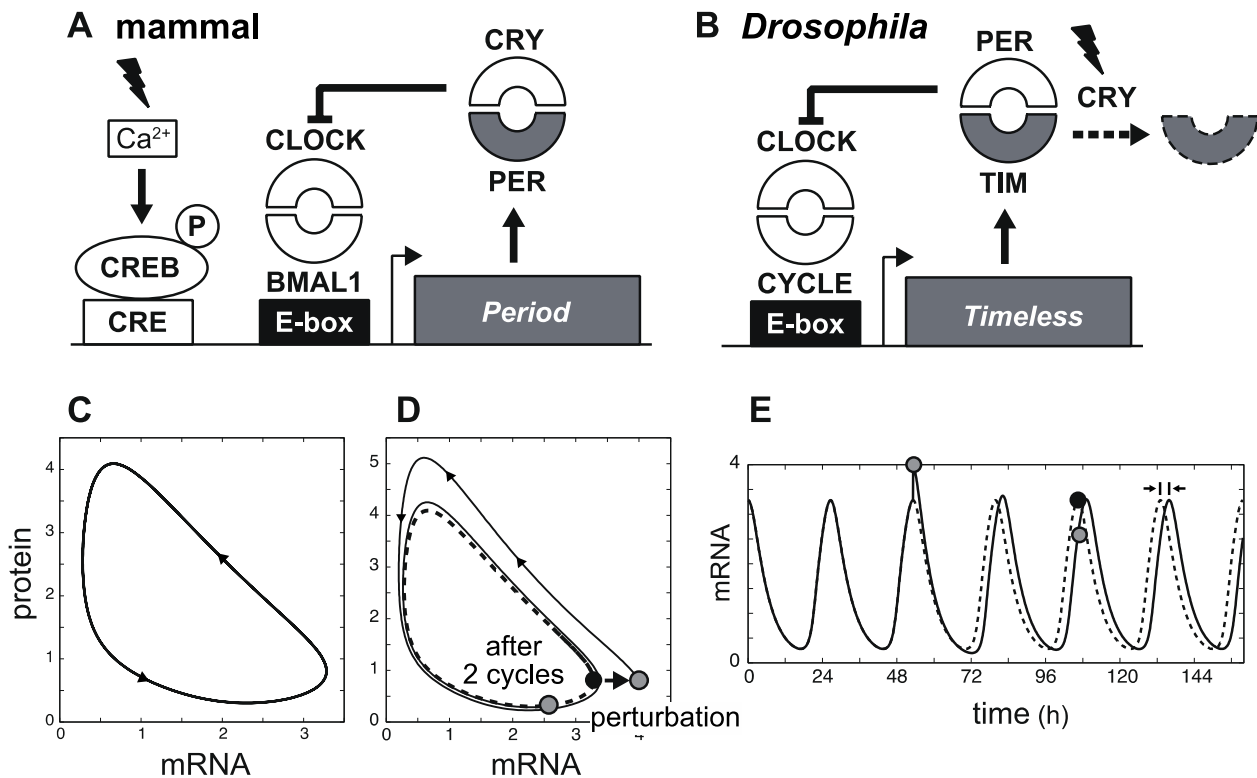


図1 概日時計への光シグナルの入力と位相変化

(A) 哺乳類の時計遺伝子 *Period* の転写調節と光シグナルによる転写誘導。光シグナルは神経細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させる。 Ca^{2+} 濃度の増加によりリン酸化酵素が活性化され CREB がリン酸化される。リン酸化 CREB は CRE 配列に結合し *Per* の転写を誘導する。
 (B) ショウジョウバエの *timeless* の転写制御。光シグナルは CRY によって受容され、TIM の分解を促進する。
 (C) リミットサイクル。矢印は軌道の進行方向を示す。
 (D) 黒丸のタイミングで mRNA 濃度を増加させる (矢印)。2 サイクル後に軌道はリミットサイクルに戻るが、その位相は mRNA 濃度の増加前と変化している (灰色丸)。
 (E) D の結果の時系列表示。実線は mRNA の濃度を一過的に増加させた場合を、点線は摂動がない場合のリズムを示す。ピーク時刻の時間差として位相差を測ることができる (矢印)。

を及ぼすことで、概日時計は明暗サイクルに同調することが可能となる。

概日時計の同調能を調べる方法として、恒常暗において生物に短時間の光パルスを投与し、それによる行動リズムの変化を調べる方法が用いられてきた。哺乳類の場合には、活動開始時刻や終了時刻の変化を測定することで、光パルスにより概日時計が進んだか遅れたかを判定できる。活動開始もしくは活動終了は概日時計の 1 サイクル内の決まった「時刻」で起きると考えられ、概日時計がどの「時刻」を指しているかの指標となる。概日時計によって決まる個体の主観的な「時刻」は位相とも呼ばれ、位相は概日時計が 1 サイクルのうちどの点にいるかを表す。恒常暗での光投与による位相変化は、光投与時刻を横軸に、その時刻での位相変化を縦軸にプロットした位相応答曲線 (phase response curve; PRC) として表示される^{8,9}。キイロショウジョウバエやマウスの PRC は、位相前進期、後退期、そして位相変化の起きない不応期

(dead zone) を含んだ連続的な曲線でありタイプ 1 型と呼ばれる。これまでに PRC が測定された生物において、主観的明け方の光パルスは行動リズムの位相前進を導く。主観的夕方から夜にかけて光パルスは位相後退を導く。一方、恒常暗下で主観的昼に光パルスを投与しても、位相はほとんど変化しない。この PRC の形状によって、概日時計の光サイクルに対する同調を説明することができる⁹⁻¹¹。例えば、フリーラン周期が 24 時間よりも長いハムスターでは、PRC の位相前進領域が大きく、それにより光シグナルで概日時計を進め 24 時間の光サイクルに同調できる。フリーラン周期が 24 時間に近いラットやシロアシネズミでは、位相前進領域と後退領域の大きさがほぼ同じである。一方、フリーラン周期が 24 時間よりも短いマウスでは位相後退領域が大きく、それにより概日時計を遅らせて 24 時間の明暗サイクルに同調する。

動物の行動リズムの位相変化は、細胞・中枢・末梢組織レベルのそれぞれの段階における概日時計の位相

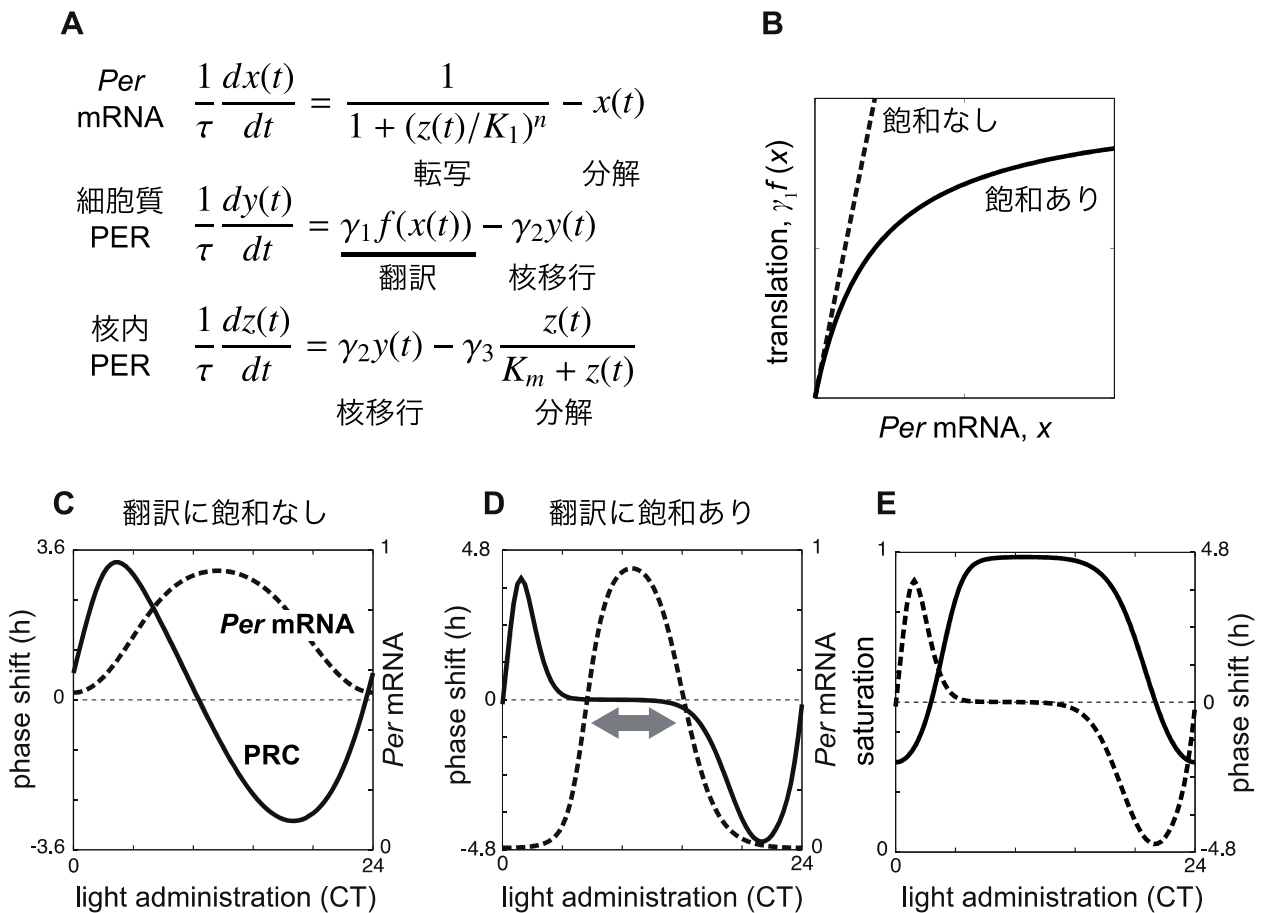


図2 哺乳類の概日時計の dead zone 形成

(A) 微分方程式モデル。翻訳は Per mRNA の濃度 x の関数。

(B) mRNA 濃度に対する翻訳率の依存性。実線は mRNA 濃度が高くなると翻訳が飽和するとした場合を、点線は mRNA 濃度に比例する場合をそれぞれ示す。

(C) 翻訳が mRNA の濃度に比例する場合 ($f(x) = x$) の PRC。

(D) 翻訳が飽和する場合 ($f(x) = x/(k + x)$, k は定数) の PRC。実線は PRC、点線は Per mRNA の濃度をそれぞれ表す。灰色矢印が dead zone を示す。

(E) 翻訳が飽和する時間帯に dead zone ができる。実線は翻訳の飽和率を表し、値が 1 に近いほど翻訳が飽和している。点線は PRC を表す。

変化によってもたらされるだろう^{7,12}。本稿では、細胞レベルの概日リズムの位相応答が個体レベルの位相応答の基盤であるという考えに基づいて、遺伝子発現レベルの位相応答について議論する。概日時計の NFL のどのような特性が、上記の PRC の形状を決めるかを紹介する。初めに連続曲線であるタイプ 1 型の PRC において dead zone が形成されるメカニズムについて議論する¹³。次に、哺乳類の位相応答における二つの Per 遺伝子 (*Per1/Per2*) の役割分担について紹介する¹⁴。

2. リミットサイクルと位相変化

数理モデルを使った概日時計の理論研究では、NFL に含まれる mRNA やタンパク質といった時計遺伝子産物の濃度変化を、微分方程式で表す方法がも

ちいられる¹⁵⁻²⁰。コンピュータを使い微分方程式の解を求めると、時間が経つと元の状態に戻る周期解が得られる。NFL によって生じる周期解は、微分方程式に含まれる濃度変数の初期値に対して頑健性をもち、異なる初期濃度からスタートしたとしても十分時間が経つと同じ周期軌道に収束する。このような特徴をもつ周期軌道はリミットサイクルと呼ばれる(図 1C)。リミットサイクルが約 24 時間の振動周期を示す場合、概日時計の数学的表現となる。細胞の状態がリミットサイクルのどの「場所」にあるかは、リミットサイクルの各点に数値(例えば 0 から 2π の間の数値)を割り振ることで指定することができる。このように割り振られた数値は位相とよばれる。リミットサイクルの周期が仮に 24 時間だとすると、位相が 2π 変化するのに 24 時間かかることになる。

ノイズなどの一過的な摂動により時計遺伝子産物の濃度がリミットサイクルから離れたとしても、時間が経つともとのリミットサイクルに戻る。しかし、リミットサイクル上のどの位相に戻るかは、摂動に依存する (図 1D, E)。概日時計の光シグナルに対する応答を問題とする場合、光シグナルによって誘発される生化学反応の変化を摂動としてとらえ、それによる位相変化を調べる。光パルスが加わる以前よりも進んだ位相に戻った場合は、光パルスにより概日時計が進んだことになる。逆に遅れた位相に戻った場合には、時計が遅れたことになる (図 1D, E)。摂動の前後の位相変化は $-\pi$ から π の間の数値で表すことができる。また、リミットサイクルの周期との関係から概日時計が何時間変化したかで位相変化を表すこともできる。例えばピーク時刻の差を計算することで、位相変化を時間の単位で測ることができる (図 1E 矢印)。慣習的に位相前進は正の値で位相変化量を表し、位相後退は負の値で表す。摂動が加えられた位相 (もしくは主観的時間) を横軸に、位相変化量を縦軸にプロットすることで PRC が得られる。位相変化量の大きさ (絶対値) はリミットサイクルの性質や摂動の強さに依存する。位相変化量の大きさが π (周期の 1/2) に到達する PRC はタイプ 0 型と呼ばれる。位相変化量の大きさが π よりも十分小さい場合には、PRC は 0 の周りで変化する連続した曲線になりタイプ 1 型と呼ばれる。以降ではタイプ 1 型の PRC に関して議論する。

3. Dead zone の数理解析

キイロシヨウジョウバエやマウスといった幅広い生物種で主観的昼の数時間のあいだは光パルスを投与しても概日時計の位相が変化しない。dead zone では光シグナルに対する概日時計の位相変化量が低下するため、日中に光照度が増変したとしても位相に大きな影響を及ぼさないことが理論研究によって報告されている²¹⁻²³。また、PRC に dead zone が含まれると、日の出 (もしくは日の入り) と概日時計の間の位相関係を日長が変化した場合でも一定に保てること、数理モデルを用いた研究によって示されている²⁴。

dead zone を作り出す機構にはどのようなものが考えられるだろうか。これまで哺乳類では、主観的明期には *Per* 遺伝子が光シグナルによって転写誘導されずそのため位相変化が起きない、と考えられてきた²⁵⁻²⁸。この概日時計への光シグナルのゲーティングの分子メカニズムは分かっていないが、光入力を遮ることにより日中の光シグナルの変動の影響を遮断するこ

とができる。しかし、細胞内の *Per* の転写量のゆらぎの影響などゲート内部で起きるノイズの影響を減少させることはできない。このような転写量のゆらぎはリミットサイクルから細胞の状態を逸脱させ、位相を変化させうる。dead zone をつくるもう一つの方法は、摂動に対するリミットサイクルの応答性自体を主観的昼に低下させることである。リミットサイクル自体の応答性が低下すれば、光照度のゆらぎだけでなく、遺伝子発現のゆらぎに起因する位相の変動も低下すると予想される。前述のように、リミットサイクルは NFL によって生じる。NFL に含まれる生化学反応によって dead zone をつくれば、光シグナルと遺伝子発現のゆらぎの両方に対応することができる。

哺乳類の NFL による dead zone 形成: 哺乳類の NFL によって dead zone をつくるには、どのような反応が必要だろうか。この問いに答えるために、光シグナルによって発現が誘導される *Per* mRNA とタンパク質のダイナミクスに着目する。*Per* mRNA 濃度、細胞質 PER タンパク質濃度、核内 PER タンパク質濃度を変数とした 3 変数微分方程式モデルを作成した (図 2A)¹³。転写された *Per* mRNA の濃度に比例して、細胞質で PER タンパク質が翻訳される (図 2B)。PER タンパク質は核内に移行し、転写を抑制する。哺乳類の時計中枢組織である SCN では、日中に *Per* mRNA 転写リズムが極大となる^{25,26,29}。そこで、*Per* mRNA 濃度が高い時間帯を、数理モデルにおける主観的明期と定義した。このモデルをシミュレーションした場合、光パルス投与により位相前進と後退は起きるが、数時間にわたる dead zone は現れなかった (図 2C)。そこで、この単純なモデルを雛形とし生化学反応を付加していくことで、dead zone が生じるメカニズムを明らかにする。

モデルに含まれる生化学反応を表す関数型をいろいろと変えていったところ、mRNA 濃度が高い場合に PER タンパク質の翻訳が飽和してしまうと、主観的明期に dead zone が形成されることが分かった (図 2B, D)。これは、*Per* mRNA 濃度が高い明期では翻訳が飽和してしまい、光パルスによって *Per* mRNA がさらに誘導されてもタンパク質濃度は変化せず、位相変化が起きないためである。一方、明け方や夕方、および夜の時間帯では *Per* mRNA 濃度が低いため、翻訳が飽和していなくその時間帯の光パルスは PER タンパク質濃度を増加させ、位相変化を導く (図 2E)。言い換えると、翻訳の飽和が NFL 内のゲートとしてはたらき、dead zone が形成される。PER タンパク質の翻訳の飽和は起きうるのだろうか。*Per* mRNA に

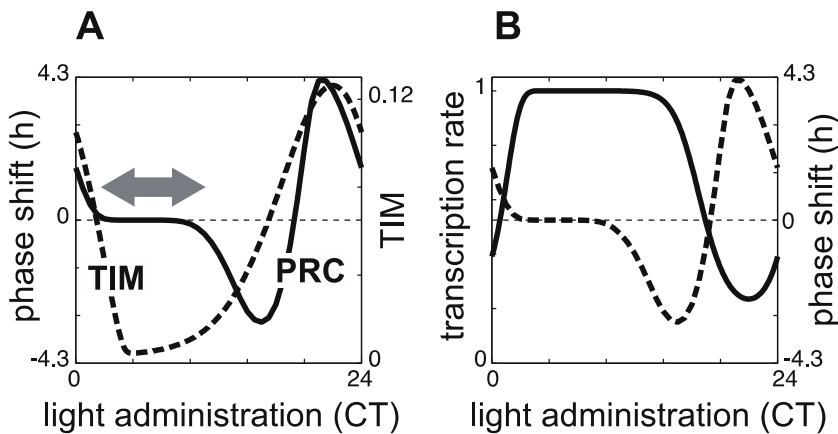


図 3 キロシヨウジョウバエの概日時計の dead zone 形成
 (A) PRC (実線) と TIM タンパク質の濃度 (点線)。灰色の矢印が dead zone を示す。
 (B) *tim* mRNA の転写速度 (実線) が飽和しているときに dead zone が生じる。点線は PRC を示す。

対して細胞内のリボソーム量が足りなくなるとは考えにくい。先行研究により、PER1 タンパク質の翻訳には RNA 結合タンパク質である LARK が必要となることが分かっている³⁰。これらの時計遺伝子産物の翻訳に必要なタンパク質の数が限られていれば、モデルで予測した翻訳の飽和が細胞内で起きる可能性がある。

シヨウジョウバエの NFL による dead zone 形成:
 キロシヨウジョウバエの PRC にも哺乳類と同様に dead zone が含まれる。シヨウジョウバエの場合、光シグナルは神経細胞内の CRY タンパク質によって受容される (図 1B)。CRY は時計タンパク質である TIM の分解を導き、それによって概日時計の位相変化が起きる。TIM は主観的明期に極小値をとる。シミュレーションを行うと、振動の谷の TIM 濃度が低いほど dead zone が形成されやすいことが分かった (図 3A)¹³。TIM は転写抑制因子として機能するため、その濃度が低い主観的明期には、*tim* 遺伝子の転写が最大速度で起きている。すなわち、転写量が飽和している (図 3B)。その時間に光シグナルによって TIM を分解しても、転写速度が最大値に飽和しているためそれ以上 *tim* mRNA を増やすことができない。*tim* mRNA 濃度が変化しないため TIM タンパク質濃度の変化も起きず、位相変化も起きない。実際のシヨウジョウバエの細胞でも、*tim* mRNA の転写速度には利用できる RNA ポリメラーゼの数などで決まる上限値が存在すると考えられる。TIM の濃度が十分低く転写速度がこの上限値に到達していれば dead zone が生じるとモデルから予測される。

まとめると、哺乳類とシヨウジョウバエでは光シグナルによって誘導される生化学反応は異なるが、どちらも飽和反応によって光シグナルの影響がキャンセルされる。このように、dead zone は NFL に含まれる生化学反応の飽和を利用して形成されることが、

数理モデルを用いた解析により予測された。

4. 哺乳類時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の位相応答における役割分担

哺乳類では *Per1/2/3* の三つの *Per* 遺伝子がゲノム中に存在している。このうち *Per3* は光シグナルによって誘導されず、概日時計の位相応答に関与しないことが知られている^{11,31}。一方、*Per1/2* は光シグナルにより SCN において転写が一過的に誘導される (図 4A)。PER1 と PER2 タンパク質はアミノ酸配列がよく保存されており、共に CRY と複合体を形成し CLOCK/BMAL1 に結合することでその転写誘導能を抑制する。すなわち *Per1* と *Per2* の二重の NFL が概日リズムの発振と位相応答に関与する。恒暗条件下での mRNA のフリーランリズムを計測すると、*Per1* mRNA 濃度は主観的明期に極大となる。*Per2* mRNA 濃度は *Per1* から約 4 時間遅れて極大となる^{25,32,33}。この約 4 時間のピーク時間差をつくるには、*Per2* のプロモーターに存在する特定の塩基配列と、PER2 タンパク質自身による制御が必要であることが示唆されている^{34,35}。4 時間のピーク時間の差は *Per1* と *Per2* の間に何らかの機能的な違いをもたらすのであろうか？

この問いに答えるため、*Per1* と *Per2* の遺伝子産物の濃度変化をモデル化し数理解析を行なった¹⁴。転写・翻訳によって作られた PER1/2 タンパク質は、自身と相手の転写をプロモーターに結合することで抑制するとする。*Per1* mRNA 濃度と *Per2* mRNA 濃度のピーク時間の差をパラメタとしてその影響を調べるために、遅延型の微分方程式を解析に使用した。遅延型微分方程式では、mRNA が転写されリボソームで翻訳に利用可能となるまでにかかる時間を、時間遅れパラメタで表現する。この時間遅れの長さが *Per1*

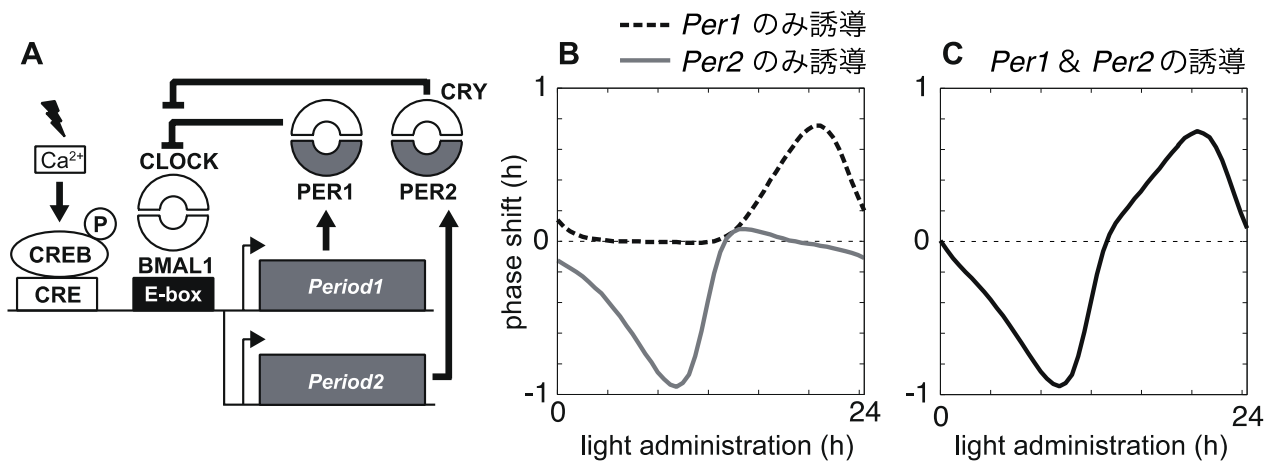


図4 哺乳類 *Period1/2* (*Per1/2*) の位相応答における役割分担

(A) *Per1/2* の転写制御。

(B) *Per1* と *Per2* のどちらか片方を短時間の光パルスで一過的に誘導した場合の PRC。点線は *Per1* のみを誘導した場合。実線は *Per2* のみを誘導した場合。

(C) *Per1* と *Per2* の両方を一過的に誘導した場合の PRC。単純化のため、このモデルには図2のモデルで仮定した翻訳の飽和が含まれていない。そのため PRC には不応期が含まれない。

と *Per2* の間で4時間異なるとすることで、詳細なメカニズムを仮定しなくともピーク時間の差を再現することができる。数理モデルの利点は、*Per1* もしくは *Per2* のどちらか片方のみを一過的に転写誘導しリズムの変化を調べることで、両方の NFL の存在下(野生型条件下) で二つの機能を区別できる点にある。これは片方の NFL を欠失させる *Per1* もしくは *Per2* 遺伝子のノックアウト実験¹¹とは異なることに注意していただきたい。

シミュレーションを行ったところ、*Per1* と *Per2* の間に4時間のピーク時間差があると、光シグナルに対する位相応答において役割分担が生じることが分かった(図4B)。すなわち、光シグナルによる *Per1* の一過的な発現誘導は主に位相前進を導き、*Per2* の誘導は位相後退を導く。この分担はピークの時間差に依存しており、例えば1時間と時間差が短い場合には4時間でみられたような明確な分担は起きない。*Per1* と *Per2* のピークの時間差を1時間から徐々に大きくし *Per1* のみの発現誘導によって PRC を求めたところ、ピークの時間差とともに単調に位相後退領域が縮小し4時間付近を境に消失した。同様に *Per2* のみの発現誘導によって PRC を求めると、位相前進領域が縮小し同じくピークの時間差が4時間付近で図4Bに示すようにほぼ位相後退領域のみとなった。ピークの時間差を4時間以上にした場合でも同様の役割分担が起きる。この分担のメカニズムは次のようになる。*Per1* mRNA の増加期に光パルスによって *Per1* mRNA をさらに誘導すると、PER1 タンパク質濃度

の増加が速くなり、転写抑制が早くはたらき位相が前進する。一方、*Per1* mRNA の減少期に *Per1* mRNA を誘導しても、その時間帯には遅れて発現した PER2 タンパク質が十分量あるため、PER1 タンパク質の増加は位相に影響を及ぼすことができない。一方、*Per2* mRNA の増加期に *Per2* を一過的に誘導しても、先行して発現している PER1 タンパク質がすでに十分量あるため、PER2 タンパク質は位相に影響しない。*Per2* mRNA の減少期には、PER1 タンパク質濃度はすでに低下しているため、*Per2* を誘導すると余剰にできた PER2 タンパク質が転写抑制状態を延長し、位相後退が起きる。

実際の哺乳類の SCN では、*Per1* と *Per2* の両方が光シグナルによって転写誘導される。*Per1* と *Per2* を同時に転写誘導するシミュレーションを行ったところ、PRC の形状は *Per1* のみを転写誘導した場合の PRC と、*Per2* のみを転写誘導した場合の PRC を足し合わせたものに近くなることが分かった(図4C)。このことは、光シグナルによる *Per1* と *Per2* の転写誘導量の違いが、PRC の位相前進領域と後退領域の大きさに影響することを示唆する。PRC の形状は生物種によって異なる¹⁰。ハムスターの PRC は位相前進領域の面積が後退領域に対して大きい。反対に、マウスの PRC は後退領域の面積の方が大きい。上記の数理モデルの結果は、ハムスターでは *Per1* が光シグナルにより転写誘導されやすく、マウスでは *Per2* が転写誘導されやすい可能性を示唆している。一方で、*Per1* 欠失変異体マウスでは位相後退領域が野生型に

比べ顕著に大きくなり、*Per2* 欠失変異体マウスではわずかに前進領域が大きくなることが報告されている¹¹。そのため野生型哺乳類の PRC の形状の成り立ちを理解するには、(1)ノックアウト実験の結果と(2)*Per1*と*Per2*の二重 NFL の役割分担、の両方を考慮する必要があるだろう。

数理モデルの結果は、*Per1*もしくは*Per2*のどちらか片方のみを転写誘導できる化合物が存在すれば、その投与により位相前進もしくは後退のみが起きることを示唆している。このような化合物を単離できれば、数理モデルの予測を検証するだけでなく、効果的なリズム障害治療薬候補になるかもしれない。

5. おわりに

本稿では、PRC の形状に関する数理解析について紹介した。Dead zone の解析では、光シグナルが NFL へと入力される分子メカニズムは哺乳類とショウジョウバエで異なるが、生化学反応の飽和という共通したメカニズムで dead zone が生じる可能性を示した。このように遺伝子制御の背後にある共通性を明らかにできる点が、数理モデルを使うことの利点の一つである。また、哺乳類 *Per1/2* の解析では、どちらか片方のみを転写誘導した場合をシミュレーションすることで、それぞれの機能を切り分けることができた。野生型動物では光シグナルによって両方の *Per* 遺伝子が転写誘導されてしまうため、このような数値実験ができることも数理モデルの強みである。

紹介した数理モデルは細胞レベルでの位相変化を記述するものであった。これらの結果を基礎として、今後は組織および個体レベルでの位相応答を記述する手法を確立していく必要があるだろう。統計物理学で研究されている結合振動子集団の位相応答理論がその手助けとなるかもしれない³⁶⁻³⁸。

6. 謝辞

本稿は金沢大学 理工研究域の程 肇先生との共同研究に基づいています。UT Southwestern Medical Center の山崎 晋先生には原稿内容に関して貴重なコメントをいただきました。ここに感謝いたします。

参考文献

1. Tischkau, S. A., Mitchell, J. W., Tyan, S. H., Buchanan, G. F., & Gillette, M. U. Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for

- light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J. Biol. Chem.* **278**, 718-723 (2003).
2. Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7728-7733 (2002).
3. Ceriani, M. F. *et al.* Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* **285**, 553-556 (1999).
4. Koh, K., Zheng, X. & Sehgal, A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* **312**, 1809-1812 (2006).
5. Lin, F. J., Song, W., Meyer-Bernstein, E., Naidoo, N. & Sehgal, A. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7287-7294 (2001).
6. Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M., & Sehgal, A. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* **285**, 1737-1741 (1999).
7. Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685 (2000).
8. Johnson, C. H. in *Circadian Clocks from Cell to Human* (eds T. Hiroshige & K. Honma) 209-249 (Hokkaido University Press, 1992).
9. 本間研一, 本間さと & 広重力. *生体リズムの研究*. (北海道大学図書刊行会, 1989).
10. Daan, S., & Pittendrigh, C. S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* **106**, 253-266 (1976).
11. Pendergast, J. S., Friday, R. C., & Yamazaki, S. Photic entrainment of period mutant mice is predicted from their phase response curves. *J. Neurosci.* **30**, 12179-12184 (2010).
12. Koinuma, S., Kori, H., Tokuda, I. T., Yagita, K., & Shigeyoshi, Y. Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells. *PLoS One* **12**, e0181223 (2017).

13. Uriu, K., & Tei, H. A saturated reaction in repressor synthesis creates a daytime dead zone in circadian clocks. *PLoS Comput Biol* **15**, e1006787 (2019).
14. Uriu, K., & Tei, H. Complementary phase responses via functional differentiation of dual negative feedback loops. *PLoS Comput Biol* **17**, e1008774 (2021).
15. Kurosawa, G., Mochizuki, A., & Iwasa, Y. Comparative study of circadian clock models, in search of processes promoting oscillation. *J. Theor. Biol.* **216**, 193-208 (2002).
16. Leloup, J. C., & Goldbeter, A. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7051-7056 (2003).
17. Novak, B., & Tyson, J. J. Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 981-991 (2008).
18. Ueda, H. R., Hagiwara, M., & Kitano, H. Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm. *J. Theor. Biol.* **210**, 401-406 (2001).
19. Kim, J. K., & Forger, D. B. A mechanism for robust circadian timekeeping via stoichiometric balance. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 630 (2012).
20. Kurosawa, G., Fujioka, A., Koinuma, S., Mochizuki, A., & Shigeyoshi, Y. Temperature-amplitude coupling for stable biological rhythms at different temperatures. *PLoS Comp. Biol.* **13**, e1005501 (2017).
21. Hasegawa, Y., & Arita, M. Circadian clocks optimally adapt to sunlight for reliable synchronization. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20131018 (2014).
22. Hasegawa, Y., & Arita, M. Optimal implementations for reliable circadian clocks. *Phys. Rev. Lett.* **113**, 108101 (2014).
23. Pfeuty, B., Thommen, Q., & Lefranc, M. Robust entrainment of circadian oscillators requires specific phase response curves. *Biophys. J.* **100**, 2557-2565 (2011).
24. Geier, F., Becker-Weimann, S., Kramer, A., & Herzog, H. Entrainment in a model of the mammalian circadian oscillator. *J. Biol. Rhythms* **20**, 83-93 (2005).
25. Miyake, S. *et al.* Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* **294**, 41-44 (2000).
26. Shigeyoshi, Y. *et al.* Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* **91**, 1043-1053 (1997).
27. Hamada, T. *et al.* Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **23**, 8820-8826 (2003).
28. Hughes, A. T., Fahey, B., Cutler, D. J., Coogan, A. N., & Piggins, H. D. Aberrant gating of photic input to the suprachiasmatic circadian pacemaker of mice lacking the VPAC2 receptor. *J. Neurosci.* **24**, 3522-3526 (2004).
29. Ueda, H. R. *et al.* System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.* **37**, 187-192 (2005).
30. Kojima, S. *et al.* LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1859-1864 (2007).
31. Takumi, T. *et al.* A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVL. *EMBO J.* **17**, 4753-4759 (1998).
32. Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., & Lee, C. C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* **91**, 1055-1064 (1997).
33. Takumi, T. *et al.* A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**, 167-176 (1998).
34. Ogawa, Y. *et al.* Positive autoregulation delays the expression phase of mammalian clock gene *Per2*. *PLoS One* **6**, e18663 (2011).
35. Yamajuku, D. *et al.* Identification of functional clock-controlled elements involved in differential timing of *Per1* and *Per2* transcription. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7964-7973 (2010).
36. Schmal, C. *et al.* Weak coupling between intracellular feedback loops explains

dissociation of clock gene dynamics. *PLoS Comp. Biol.* **15**, e1007330 (2019).

37. Kori, H., Kawamura, Y., Nakao, H., Arai, K., & Kuramoto, Y. Collective-phase description of coupled oscillators with general network structure. *Phys. Rev. E* **80**, 036207 (2009).
38. Hannay, K. M., Forger, D. B., & Booth, V. Seasonality and light phase-resetting in the mammalian circadian rhythm. *Sci. Rep.* **10**, 19506 (2020).

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

以下に、査読者と執筆者とのやりとりを許可を得て掲載いたしました。

(重吉)

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

査読者 1

Q1. *timeless* の転写が飽和することは実際にありうるのでしょうか。

A1. TIM タンパク質の濃度が振動の谷でほぼゼロならば転写抑制がかからないため、*tim* mRNA の転写速度は利用できる RNA ポリメラーゼの数や RNA ポリメラーゼの DNA 上での移動速度などで決まるある上限値に到達する（つまり上限値に飽和する）と考えられます。この説明を書き加えました。実際に TIM タンパク質の濃度が低い時間帯に、光シグナルにより転写量が変化しないかどうかは、実験により検証する必要があります。

Q2. (本文)「この分担はピークの時間差に依存しており、例えば 1 時間と時間差が短い場合には 4 時間でみられたような明確な分担は起きない」。4 時間という量がどこまで特別なのか、よくわかりませんでした。ピークの時間差が 3 時間とか 8 時間でも同じことが起きるのでしょうか。

A2. *Per1* のみを誘導した場合の PRC と *Per2* のみを誘導した場合の PRC の違いは、この二つの間のピークの時間差に単調に依存します。例えば、ピークの時間差が 1 時間の場合には、*Per1* を光誘導した場合にも時間帯によって位相後退が生じます。ピークの時間差を徐々に大きくしていくと、位相後退領域が単調に減少していき、4 時間付近で図 4B 点線で示したように位相後退領域が消失し前進領域と位相変化が起きない領域のみになります。ここからピークの時間差をさらに 8 時間まで増加させても、PRC はほとんど変化しませんでした。つまり「4 時間」というのは *Per1* と *Per2* の位相応答への寄与が分離する（おおよそ）最小のピーク時間差にあたります。

Q3. 図 4 の位相応答曲線に不応期 (dead-zone) が表れていないことは、問題ないのでしょうか。不応期の出ている図 2,3 の位相応答曲線とは数値シミュレーションの設定が違うためでしょうか。

A3. 数理モデルを単純化するため、図 4 のモデルには、図 2 のモデルで仮定した翻訳の飽和を含めていません。そのため、図 4C の PRC には不応期 (dead zone) が含まれていません。図 2 と図 4 ではモデルの違いがあることを、図 4 のレジェンドに書き加えました。この *Per1/Per2* のモデルに翻訳の飽和を含めれば、dead zone が現れると考えられます。

視交叉上核研究今昔

本間 さと[✉]

札幌花園病院睡眠医療センター

1972年に、哺乳類の生物時計が視床下部視交叉上核(SCN)に局在することを示す2編の論文が発表され、半世紀がたった。この小さな神経核には、サーカディアンリズム発振、光同調、全身の末梢時計の同調などの機能がぎっしり詰まっている。その後、培養下での長期計測や移植なども可能となり、研究は飛躍的に発展した。21世紀の到来とともに、SCNは哺乳類唯一の概日時計から、末梢時計を統括する中枢時計へと、新たな機能が明らかとなってきた。SCNの組織学、リズム発振や同調に関わる分子メカニズム、細胞振動とネットワークなどについては多くのすぐれた論文や総説があるので、ここでは、SCN研究を巡る個人的な思い出、SCNの私的研究史について述べさせていただく。偶然にも1972年は私が大学院生として研究を開始した年であり、その後、SCNに深くかかわることになったことには運命を感じている。分散培養やスライス培養、マルチ電極ディッシュアレイ、マルチ機能の同時イメージングなど、新しいプロジェクトと技術開発は悪戦苦闘、挫折の連続ではあったが、今となっては、それもまた、楽しい思い出である。

1. はじめに

1972年に視交叉上核(SCN)の破壊によりラットの行動¹や副腎コルチコステロン²の概日リズムが消失したことを示した2編の論文が発表され、SCNが哺乳類の概日時計中枢であることが明らかになってから、今年が50周年である。

SCNの発見までは、概日時計があることにはあるが、特定の組織に存在するとは考えられていなかった。1972以降、1999年に末梢時計³の存在が明らかになるまではSCNが哺乳類では「唯一の」生物時計と考えられてきた。その後、SCNは「唯一無二」の生物時計から「one of them」となり、リズム発振よりも、むしろSCNが中枢時計として機能する中心的なメカニズム、すなわち振動ネットワークに注目が集まってきた。哺乳類が中枢神経内に全身をコントロールする中枢時計をもつ意義について再度、考え直す時期にきていると思う。

2. はじまりは *In vivo* 観察実験から

SCNが概日時計中枢であることを示した2編の論文は、これが大発見かと拍子抜けするほど、実に短い論文である。図表もろくにない。昨今ならば、とても査読を通りそうもない。Stephan & Zuckerの論文¹ではSCNを破壊したラットの行動量を明期と暗期で統計

をとったデータに加え、2例で飲水リズムの消失と飲水および輪回し行動のリズムが消失していることを示しているだけで、周期解析や、破壊巣の顕微鏡写真も載っていない。Moore & Eichlerの論文²はShort Communicationであり、ただし、こちらは、破壊による副腎コルチコステロンリズム消失だけでなく、盲目にするとリズムがフリーランするが、Primary Optic tractの切断やAccessory optic tractの切断ではリズム同調が持続していること、SCNの尾側のHalasz knifeによる神経切断でもコルチコステロンリズムが消失するが吻側の神経切断ではリズムが持続することを報告し、SCNへの光入力視神経が脳内に入ってすぐに生じていることや、SCNから尾側~背側方向の神経出力がHPA-axisへのリズム出力を支配していることを示している。SCNの破壊を、行動リズムではなく瞳孔の対光反射で確認している点も興味深く、短くても含蓄に富む論文である。信じられないかもしれないが、行動測定は、当時、測定機器が高価で多数を揃えることができず、コルチコステロン測定の方が容易であった。私の所属した当時の生理学教室も、毎日大量の血漿コルチコステロンの検体を測定していた。

しかし、正確には、これら2編の論文では、SCNは概日時計からのFinal Common Pathにある組織である可能性が否定できていない。1979年に、Inouye &

✉ sathonma@med.hokudai.ac.jp

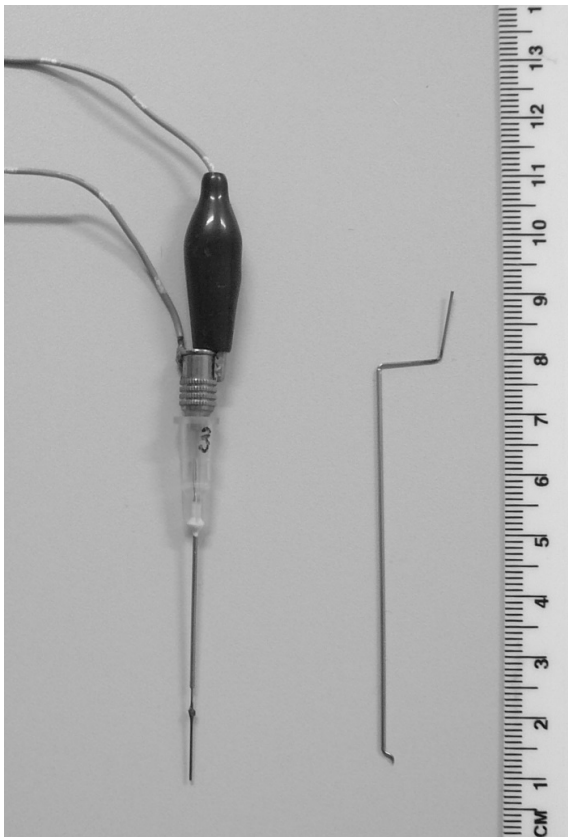


図1 Halasz ナイフ (右) と SCN 破壊のための手製電極 (左)
 Halasz ナイフ (右): ステンレスパイプあるいは 21~23 号のカテラン針を 5~6 cm にダイヤモンドカッターでカット。ロールしていないピアノ線を 10 cm 程度にカットして、先端を三角形にグラインダーで削り、刃を作成する。刃は薄くて鋭いと切れがよいが、ナイフの刃を曲げる際、破損しやすい。目的とする大きさの刃を作ったら、ステンレスパイプに入れ、刃の方向にハンドルを作る。その際できる上下の「遊び」が、脳底に刃先が達したサインとなるので、遊びを 1 mm ほど作る。ナイフを脳底に下ろした際、ハンドル部分が浮き上がる瞬間をとらえて、脳底の位置を正確に記録し、そこから 0.5 mm 上げる。脳底部分の骨格標本をつくり、定位脳固定装置に設置して、ナイフが脳底ぎりぎりまで 360 度回転できるように、固定位置を決める。私が使っていた Wistar ラットでは上顎切歯の位置を耳穴より 5 mm 下げる位置で、SCN 部分の脳底が平らになった。
 ラット視交叉上核破壊用電極 (左): Halasz ナイフ同様、二重構造とし、26~28G のカテラン針の先端をダイヤモンドカッターで切り落とし、マニキュアやカシューで絶縁コーティングし、ホルダーとなるステンレスパイプ (電極の太さに合わせ 22~23G から選ぶ) に入れる。ステンレス針の先端を研磨して絶縁を剥がし、常に一定の通電量が得られるようにし、壁面の絶縁は電気分解でチェックする (絶縁がはげると泡が出る)。電極の上部にストッパーのためのマニキュアの塊を付け、電極の上下方向に 1~1.5 mm の遊びを作る。脳底に電極が達したら、電極が持ち上がる。ここから 0.5 mm 上の位置で通電する。定位脳手術では、前後の原点は Bregma とするが、左右の原点は、上矢状静脈洞の中点とする。このため、SCN の前後を含み 5 mm ほどの正方形に頭蓋骨を剥がし、左右の中点を決め、硬膜下に脳実質を極力傷つけないように絹糸を通し、静脈洞を左右に牽引して出血を避け、正中線から左右 0.5 mm の位置で垂直に電極を下ろす。これで、X 軸と Z 軸方向の位置決め精度が上がる。

Kawamura の SCN island の論文が出て、初めて、SCN そのものが概日時計中枢であることが証明されたわけであり、2 名の日本人先輩の業績をいま一度強調しておきたい。

1972 年に大学院に入って与えられた最初のテーマは、指導教員の廣重力 助教授 (当時) がバイオアッセイ法を開発して取り組んできた CRH についてで、私の担当は CRH リズムの性差だった。Estrous cycle の変化が明暗サイクルの何時ごろに生じるか、という泥臭い予備実験から開始した。間もなく、当時、内分泌関連の雑誌に何報も論文が出ていた B. Halasz の開発した Halasz Knife を使って Hypothalamic island を作るようにとの指示が出た。Inouye & Kawamura の論文が発表される前であったので、先見の明があったわけであるが、どうやって Halasz Knife を作るのか皆目見当がつかない。Endocrinology に出ている図を参考に金属プレスで刃を作ってもらったりしたが、全く使い物にならなかった。今ならば、メールを出して著者に聞く、という手があるだろうが、当時は手紙もタイプライターの時代である。あてがなく、どうしたものかと思っていたところ、1973 年に京都で開催された日本内分泌学会総会で、UCLA の Sower のラボから帰国したばかりの林纈治 先生 (東京都神経研) が Halasz knife を仔ラットに応用した発表を聞くことができた。

会場で質問する勇気がなかったが、たまたま帰途の京都からの新幹線のホームで見かけて図々しく質問し、翌日、当時の勤務先であった国立がんセンターを訪ねて元祖 Halasz が作っていたナイフの作り方を教えてもらった (図 1 右)。以後、私も、実験手技を教えてほしいという申し出には、出来る限り丁寧に対応してきた。しかし、このナイフを使っただけの実験結果が論文になるには、さらに 10 年の月日がかかった (図 2 A) 5。

3. ほ乳類概日時計リズムの生後発達と母子同調： 「生みの親 vs. 育ての親」論争

生理学の教員として最初に取り掛かった研究テーマは、概日振動発振と母子同調であり、すでに教室では、盲目仔ラットの cortisol コルチコステロンリズムの生後発達を丹念に解析し、妊娠中の母親のリズムが基本的に仔のリズムを同調させるが、授乳中の母親のリズムも影響することがあると明らかにしていた⁶。一方、同様のテーマで研究をしていた高橋清久先生のグループでは、育ての親がリズムを同調するとデータの提示していた⁷。Reppert と Schwartz も母親による胎児 SCN の同調を発表しており⁸、概日時計の振動開始時期と母親による同調、出生後の非光同調の可能性といった、現在でも未解決の内容を含む研究テーマであったが、如何せん、当時は、離乳後にならないと表現型リズムが

測定できなかった。このため、実験デザインを工夫して、コルチコステロンや自発行動（当時ようやくアニメックスを複数台そろえて、自動解析ができるようになっていた）などのリズムを指標に、出生前にさかのぼっての振動発振を推測する方法を検討した。

胎児にとっての恒常状態を作るため、妊娠中のラットの SCN を破壊することを思いついた。そんなことをすると、流産や出産できない等の懸念はあったものの、まずはやってみるということで妊娠 3, 10, 17 日目に SCN を破壊し、仔は出生直後に盲目にし、リズムの消失した母親に離乳まで飼育させた。最初は、破壊巣が大きすぎて、母ラットのリズムは消失するものが出産できない場合がほとんどであり、帝王切開で出産させ、養母に育てさせなければならなかった。そのうちに腕を上げ、破壊巣を SCN に局限するようになると、出産・授乳が可能なラットが出てきた。妊娠 3 日の SCN 破壊では全例が流産してしまっていたが、妊娠 10 日および 17 日での破壊の結果から、母親による胎児のリズム同調と、母親の SCN 破壊による胎児のリズムのフリーラン開始を証明することができた⁹。ちなみに、メスの性周期が持続的に diestrus となるようでは、破壊巣が

SCN の尾側に大きすぎることを示しており、SCN に局限していれば、continuous estrus となる。この時の SCN 破壊方法と手製電極（図 1 左）は、その後数 10 年に渡り、教室内で継続して使われた。

生みの親か、育ての親かについては、親の子育てリズムの濃密さに依存して母親のリズムが非光因子として盲目仔ラットのリズムを同調することを示すことができ、論争に決着がついた。高橋先生のラボの母ラットは濃密な子育てをするが、我々のラボの母ラットの子育ては放任型であったことが分かり、仔の数が減らず（たとえば 2 匹）¹⁰、親に周期的制限給餌を課す¹¹、周期的母子分離をする^{12,13}等、母親のリズムが強く作用すると仔のリズムを同調することや、出生後初期ほど同調機能が強いことが分かり、ごく最近までラボの多くの教員や大学院生がこの研究に関わっている。

4. 左右の SCN の存在意義

1982 年に、Turek らのグループが、Splitting を起こしたハムスターの片側の SCN を破壊すると、行動リズムが一相性になったことから、一对の SCN のそれ

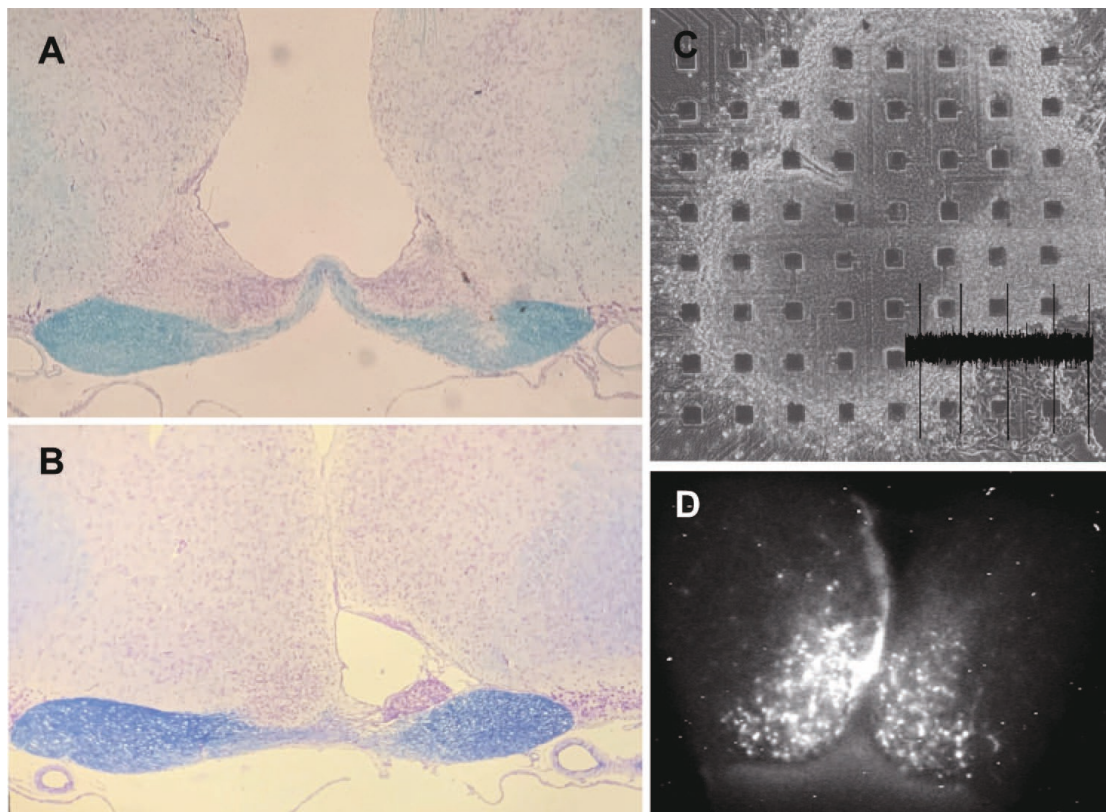


図 2 : SCN の in vivo, in vitro 実験

A : Halasz ナイフによる SCN を含む Hypothalamic island B : SCN 片側破壊。破壊巣の下にある組織は電気破壊後のグリア増殖 A,B はパラフィン切片、ルクソールファストブルー・クレシルバイオレット染色。C : マルチ電極ディッシュ上に培養したラットの SCN スライスと、右下は分散培養 SCN 神経の自発発火 D : 成獣 Per1-luc マウスの SCN スライスからの生物発光イメージ 2004 年ごろ単細胞レベルでの発光リズム計測ができるようになった初期のイメージ。

ぞれが二相性の行動の片方を支配しているとした論文を *Science* に発表して、反響を呼んだ¹⁴。ちょうど、行動リズムの開始位相と終了位相を指標にした PRC の形が異なる¹⁵、という仕事をしている最中であったため、早速、片側 SCN 破壊で位相反応曲線を作ろう、ということになった。Splitting は行動リズムの背後にある E 振動体と M 振動体の脱同調による、と考えられていたため、片側を破壊すれば、この差が分かるかと予測した。しかし、片側 SCN を完全に破壊し、他側の SCN は完全に残す、というのは至難の業だった。ネジが摩耗して肉眼でもガタつきが分かる定位脳固定装置を騙し騙し使い、20 匹以上のラットを予備実験に費やして、何とかできそうな条件を見つけた(図 2 B)。Lesion 直後に屠殺して完全な片側破壊が得られているかどうかを凍結切片で確認、2 匹続けて満足のいく結果が得られたら、その条件で続けて 10 数匹の手術を行うという毎日で、手(装置)が安定せず本番の手術ができない日もあった。結局、片側 SCN 破壊ラットの PRC は両側が健全なものと同じで、行動リズムの光同調は片側で十分機能することが分かったが、F. Davis が片側 SCN 破壊ハムスターでも Splitting は起こるといふ論文を発表し¹⁶、Negative results の常で、データはお蔵となった。Davis らの論文も、大々的に発表された Turek らの論文に比較し、注目もされず、引用されることも稀であった。

一方、Turek らは、Splitting 中に LH サージも 2 相性になるという論文を発表し、左右それぞれの SCN が下流の機能を支配する non-redundant な存在であることを示し¹⁷、さらに 2000 年になって de la Iglesia と Schwartz が、Split したハムスターの時計遺伝子のリズムが左右の SCN でそれぞれ 180 度位相が逆転していたという発表もなされた¹⁸。左右の SCN のリズムは長期に培養しても同期している。培養下の左右逆転は、400 日を超える培養でバージニアのグループが観察した例がある¹⁹。また、*Cry1/Cry2* ダブルノックアウトマウスの新生児期の PER 2 リズムで最初の 2 サイクルほど逆位相でスタートしたのち、同期した例を見ているが、見つけたら論文にできるほど珍しい。左右の神経核の間には交連線維があり、神経性の連絡があるとは言われているが、その機能は不明であり、人為的な左右の位相乖離は未だにできていない。まだまだ謎の多い組織である。

5. マルチ電極ディッシュによる単一 SCN 神経細胞リズムの測定

SCN の分散細胞培養にチャレンジしたのは 1980 年

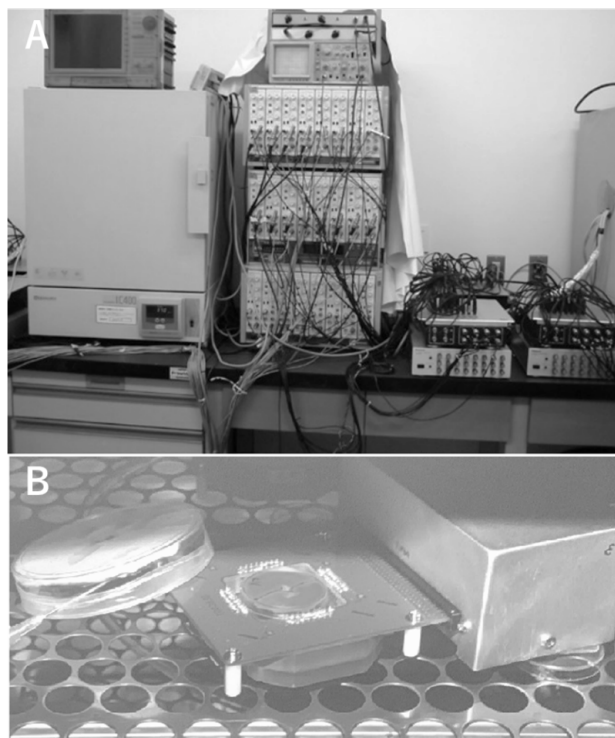


図3 8チャンネルMED測定システムを並べた自動測定系
A: 64チャンネルの機器購入以後も活躍した8チャンネルのMEDシステム。発火頻度連続測定系はカスタムメイド。写真中央は、オシロスコープと、一定条件の波形を選択してパルス信号を出すウィンド型スライサー(1セット8台のウィンド型スライサーを3セット積み上げてある)。出力されたパルスは5分毎にPCに出力された。B: インキュベータ内にMEDのディッシュとホルダーを入れ、酸素透過フィルムを使うようになるまでは、10cmシャーレに濡れた脱脂綿を貼り付けてディッシュの上にかぶせ、内部に5%CO₂/95%Airの混合ガスを流しっぱなしにした。

代の半ばだった。文献を調べ、肝臓などの初代培養をやったことのある研究仲間に聞きに行き、細菌学のラボでクリーンベンチがない場合の無菌操作を習い(アルコールランプがあれば、その直下は上昇気流ができるので、クリーンな空間ができる)と、努力を重ねたが、数年間にわたり成果が出なかった。細胞は全滅、培地には細菌が増え、抗生物質で細菌感染を抑えればカビが生え、培養室とはいえども天井からネズミの糞が落ちてくる始末であった。悪戦苦闘しているうちに、当時、高橋清久先生のラボにいた村上先生²⁰と、獨協大の渡辺先生²¹が培養 SCN からの AVP リズムを測定し発表された。そこで、村上先生からは、無血清培地の組成や細胞分散法について、渡辺先生からは、グライナー社のクローニングプレートの中央の 4well だけに細胞をまいて、培地交換は細胞のない well で行う培養液回収法を教えてもらい、トリプシンを短時間作用させ、そのトリプシンをすっかり抜いた状態で、Fire-polish したパスツールピペットをフラッシュするという方法をとることで、Viability 90%以上を維持できる

ようになった²²。いざ分散培養が可能になると、一細胞でのリズム測定をしたい。当時、NTTの研究所がマルチ電極アレイディッシュを開発し、成果を神経科学学会で発表していた。ポスター発表者に掛け合って、何とか使えないかと交渉したが、まだ開発段階にあるということで使わせてもらえなかった。その数年後、再度、学会会場で掛け合ったところ、すでにパナソニックが発売しているということを知り、早速パナソニックに「購入を検討するため」デモ機の貸出しを交渉した。この時、同時に不要となったディッシュを何枚か譲り受け、今度はMEDディッシュ上での培養法の確立に四苦八苦した。ディッシュ表面の疎水性が高く、特に新品では、表面のコーティングもできない状態だった。結局、バーナーの炎を絞り、ブルーフレームをさっと(0.2~0.3秒程度)ディッシュ表面に当てるのが最も親水性を上げることが分かった(ついでに滅菌もできた)。滅菌水で洗浄時に表面の親水性を確かめてからコーティングし、一晚、血清入りの培養液を入れてプレインキュベートすることでさらに親水性を上げるようにした。この後、ブルーフレーム法を、ガラス表面の親水性向上のため汎用した。SCNの分散培養は細胞が密なほど、元気よく培養できる。MEDプローブの中心にクローニングリングを立て、その中に高密度に細胞を撒くようになってから、高い確率で神経発火が測定できるようになった。一方、スライス培養では、組織の酸欠防止のため、培地の量を減らして組織を水没させない様にする必要がある。この時のコーティングについては、使用するコラーゲンの使用方法を間違っ

とが、安定したスライス培養の鍵となった。新田ゼラチンが発売しているセルマトリックス I-C は本来ゲル化するコラーゲンではなく、ディッシュ表面のコーティング用であるが、これを I-A や I-P と同様の方法で「間違っ」てゲル化させたところ、きわめて薄いゲルを作ることができた。ただし、メーカー推奨法ではないので、ロットによっては、全くゲル化しない。顕微鏡でメッシュ状のゲルが出来るかどうかを調べ、「当たり」のロットであることを確認する必要がある。割安の大瓶を購入したところ、「外れ」でがっかり来たこともあった。結局、論文に書かけないような様々な、尚且つほんのちょっとした工夫が実験を成功させているので、継承のため努力が必要である。

MEDプローブ上での培養法の確立には苦労したが、デモ機での測定の方は意外なほど問題なくできた。最初の数枚で、すばらしくS/Nのよい単ユニット活動が記録でき、早速、大枚をはたいて、片手に載る、おもちゃのようなプロトタイプのMEDシステムを2台購入し、培養SCN細胞の電気活動測定が始まった(図2C)。1998年にSCN神経細胞活動の周期分布を発表したが、これがパナソニックのMEDシステムでの論文第一号となった。野生型にも関わらず、発火頻度の周期が20~30時間まで広く分布したのは驚きだった²³。そして、その後の単一細胞時計とネットワーク形成による組織レベルの研究の出発点となった。この段階では一度に測定できる電極が8チャンネルであったため、64チャンネルの電極の中からどの8チャンネルを選んで測定するかは悩ましかった。発火のある神経細胞は、1日中



図4：カスタムメイドの生物発光システムとラボ培養・測定室風景
A：生物発光測定装置3号機、顕微鏡ステージ上にはアクリルのカスタムメイドミニインキュベータ、左側の温風装置から一定温度の温風と温めた蒸気を送る。酸素透過フィルムを使うようになってからは加湿器が不要となり、段々安価で作れるようになってきた。B：2009年の培養・測定室風景。後方には発光・蛍光・電気活動などの同時測定のための遮光テントが並ぶ。

発火している SCN 外の細胞であることが多く(このため、チャンネル選択の時に容易に見つかる)、一方、明瞭なリズムをもつ SCN 細胞は、1 日にせいぜい 4~5 時間程度しか発火しないものが結構ある。当たりが出るかどうかは by chance であった(図 3)。その後、さらに大枚をはたいて 64 チャンネルが同時測定できるシステムを購入し、実験の効率がぐんと上がった。さらに、二色の発光(二種の時計遺伝子発現)と蛍光(カルシウムセンサー)を加えて 4 機能同時測定も可能となった²⁴。その際、長期の培養測定では常識化していた倒立顕微鏡をやめ、正立顕微鏡とカスタムメイドのミニインキュベータを使うことで、電極によってさえぎられることなく全視野の発光・蛍光が測定できるようになった。拡張性があるのは、カスタムメイドの測定系であり、LV200 などの高価な機器にできないことが色々可能であったが、ラボの中に場所をとる遮光テントがずらっと並ぶ結果となった(図 4)。

6. ペースメーカーの安定性 : SCN は cramp を起こさない

最初はおっかなびっくり、腫物に触る様に扱っていた SCN であるが、そのうちに中枢神経組織としては、例外的に培養下でも丈夫で長持ちする組織であることが分かった。

MED システムで測定を始めた当初は、乾燥を防ぎながら pH を維持する努力をしていた。培養条件を一定するため、何年間かの間、毎日培地を半量交換するという金魚の世話のようなことをしていたが、酸素透過フィルムを使うようになってから不要となった。また、pH については、空气中で中性を維持できるよう、HEPES と NaHCO₃ の量を加減した。発火は、上述したように 1 日の一定時間のみで頻度も低い。結局 5%CO₂ も培養液の補充もせずに延々とリズムが測定できるようになった。シアノバクテリアの Kai も ATP をほとんど使わないそうであるが、SCN も、リズム発振を測定する限り、ほ乳類組織としては驚くほど栄養補給が不要の組織である。要するに、概日時計は非常にエコなシステムなのである。

一度、対照実験のため、SCN 外の中枢神経細胞を分散培養してみて驚いた。SCN 神経細胞は、ドイツシュに撒いた翌日には、せいぜい細胞体の 2 倍程度の神経突起しか伸ばさないで、中枢神経細胞はこんなもの、と思っていたが、線条体や大脳皮質の神経細胞は、数時間でめきめきと神経突起を伸ばし、翌日には盛大に同期した発火を示す。一定閾値以上のスパイクを拾うと音がなるようにセットしておくと、培養室からは周期的な神経バーストの音楽が聞こえてくる。2002 年に米国神経科学会でのミニワークショップで MED シス

テムについての講演をしたところ、「SCN は cramp を起こさないのか?」という質問が来た。そういう発想がなかったので質問内容に驚いたが、確かにペースメーカーには cramp を起こさない仕組みがある。生理学の講義では心筋細胞の電気活動を講義するが、200 ミリ秒も続くプラトー相があり、絶対不応期が長い。心筋細胞が cramp を起こせば一巻の終わりであり、滅多なことで cramp が起きないようにしている。SCN 細胞も、中枢神経の他の部位のようなバースト発火を起こさない仕組みができていて、それが分かったのはごく最近である。SCN の神経細胞は、ほぼ 100%GABAergic であるが、その生理的意義は不明であった。GABA が無い場合はどうなるか? GABA のロックアウト(GABA が産生できない GAD65/GAD67 ダブルロックアウト、および GABA が放出できない Vesicular GABA transporter ロックアウト)は呼吸不全で生後すぐに死亡するが、胎児は出産時まで育つ。そこで、胎児 SCN の培養したところ、SCN 細胞の時計遺伝子発現は、野生型と全く同じであった。ここまでは薬理実験による先行研究結果から推測は出来たが、自発発火は周期的な SCN 全体で同期したバーストを示すことが分かった。GABA がなくなったことで、SCN の神経発火は、SCN 外の中枢神経細胞並となっていた²⁵。SCN のペースメーカーが cramp を起こさない仕組みの少なくとも 1 つは、ほぼすべての神経細胞が GABAergic であることにあった。しかし、SCN 神経細胞が、他の脳部位の神経細胞に比較して、神経突起を伸ばさない理由、SCN のペースメーカーがエコなシステムであるメカニズムは、まだよくわかっていない。

半世紀の時を経て、視交叉上核にはまだまだ謎が多い。若手の皆さんが、ぜひ、この魅力的な神経核の謎解きにチャレンジしていくことを切に願っている。

参考文献

- 1 Stephan, F. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**, 1583-1586 (1972).
- 2 Moore, R.Y. & Eichler, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206 (1972).
- 3 Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-695 (2000).

- 4 Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5962-5966 (1979).
- 5 Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Dissociation of circadian rhythms in rats with a hypothalamic island. *Am. J. Physiol.* **246**, R949-R9541 (1984).
- 6 Hiroshige, T., Honma, K. & Watanabe, K.J. Prenatal onset and modification of the circadian rhythm of plasma corticosterone in blinded infantile rats. *J. Physiol.* **325**, 521-32 (1982).
- 7 Sasaki, Y., Murakami, N. & Takahashi, K. Critical period for the entrainment of the circadian rhythm in blinded pups by dams. *Physiol. Behav.* **36**, 723-736 (1984).
- 8 Reppert, S.M. & Schwartz, W.J. Maternal coordination of fetal biological clock in utero. *Science* **220**, 969-970 (1984).
- 9 Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* **114**, 1791-1796 (1984)
- 10 Honma, K., Honma, S., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Phase-setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* **252**, R256-R261 (1987).
- 11 Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Restricted daily feeding during nursing period resets circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* **252**, R262-R268 (1987).
- 12 Ohta, H., Honma, S., Abe, H. & Honma, K. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 1628-1634 (2003).
- 13 Yoshikawa, T. *et al.* Daily exposure to cold phase-shifts circadian clock of neonatal rat *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **37**, 491-497 (2013).
- 14 Pickard, G.E. & Turek, F.W. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science* **215**, 1119-1121 (1982).
- 15 Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Response curve, free-running period, and activity time in circadian locomotor rhythm of rats. *Jpn. J. Physiol.* **35**, 643-58 (1985)
- 16 Davis, F. & Gorski, R. Unilateral lesion of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J. Comp. Physiol. A* **154**, 221-232 (1984).
- 17 Swann, J.M. & Turek, F.W. Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science* **228**, 898-900 (1985).
- 18 de la Iglesias, H.O., Meyer, J., Carpino, A.Jr. & Schwartz, W.J. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* **290**, 799-801 (2000)
- 19 Yamazaki, S. & Takahashi, J.S. Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol.* **393**, 288-301 (2005).
- 20 Murakami, N. *et al.* Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res.* **545**, 347-350 (1991).
- 21 Watanabe, K., Koibuchi, N., Ohtake, H. & Yamaoka, S. Circadian rhythms of vasopressin release in primary cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **624**, 115-120 (1993).
- 22 Honma, S., Katsuno, Y., Tanahashi, Y., Abe, H. & Honma, K. Circadian rhythms of arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide do not depend on cytoarchitecture of dispersed cell culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **86**, 967-976 (1998).
- 23 Honma, S., Shirakawa, T., Katsuno, Y., Namihira, M. & Honma, K. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* **250**, 157-160 (1998).
- 24 Ono, D. *et al.* Dissociation of *Per1* and *Bmal1* circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E3699-E3708 (2017).
- 25 Ono, D., Honma, K., Yanagawa, Y., Yamanaka, A. & Honma, S. GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice. *Commun. Biol.* **2**, 232 (2019).

視交叉上核の謎

岡村 均[✉]

京都大学大学院医学研究科神経生物学分野

生体リズムは、前世紀末に時計遺伝子 clock genes が発見されたことで、根本的にその理解が変貌した。現在の理解では、時を司るわずか数個の時計遺伝子の形成する転写・翻訳フィードバックループが、数千もの遺伝子を周期的に発現させて、細胞周期、エネルギー代謝を時間的オーダーで管理している。すなわち、時を刻む時計遺伝子の時間装置は全身の細胞にあり（細胞時計）、生体リズムは全身の細胞で出現することがわかったのである。では、これまで哺乳類の生体リズムの発振中枢とされてきた視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）の役割はどうなったのであろうか？SCN では、個々の細胞の時計遺伝子の形成するフィードバックループが、密に連絡するヘテロなニューロン集団の形成する局所回路により修正・強化され、ロバストなリズムを形成していたのである。本稿では、SCN に関する研究を、著者自身の体験に基づき振り返る。

1. はじめに

視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）は、間脳の下部を占める視床下部前部で、左右の視神経が交叉して脳に入る視交叉の直上の吻側第三脳室周囲に位置する、一对の大きさ約 0.5mm 径の扁長楕円体の神経核である。ここは、発生学的には眼胞が前脳胞から形成される部位の近傍である。

神経管が閉じるころ、左右の前脳胞は窪みながら膨隆し、眼胞が隆起して眼茎となり、先端は眼杯を形成して後に網膜となる。この眼胞形成の付け根にあたる間脳の周囲に形成されるのが SCN である。この発生学的知見は、SCN と眼球との強いつながりを予測させる。

SCN の理解は、時計遺伝子発見後の 1997 年以降、大きく変化した。SCN の総括的な記載は、1991 年に発刊された「Suprachiasmatic nucleus: The Mind's Clock」¹以来、存在せず、この神経核がそのリズムを如何にして刻むのか、そのリズム位相はどのようにして決定されるのかは、未だ謎である。本稿は、時計中枢である SCN の研究が如何にして哺乳類の概日リズムの概念の確立に貢献したのかを、著者自身の体験に基づき、振り返る。なお、概日リズム研究全体についての筆者の経験は、別書にまとめたので、併せて参照されたい²。

2. 概日時計中枢である SCN の発見

まず、SCN が時計中枢として同定された歴史を振り

返ってみよう。齧歯類の生体リズムの研究が現在のように進展したのは、1920 年代末からの Curt Richter らの貢献が大きい。1960 年代に入ると米国では、概日リズムは回転カゴのような簡単な行動リズム装置で記録できることが一般にも知られるようになり³、この明瞭な行動リズムを生み出す脳内中枢の探索は一つの大きな研究の流れになっていった。その過程で、各種内分泌臓器の除去実験の結果はネガティブであり、脳内各部の微小破壊実験へと移っていった。

1972 年、Irving Zucker らはラット SCN を破壊すると行動の概日リズムが消失することを報告した⁴。同年、Robert Moore らは、SCN の破壊により血中のコルチコステロンのリズムが消失することを報告し、SCN がホルモンの概日リズムを発振させる中枢でもあることが分かった⁵。Moore らはさらに、網膜の神経節細胞に取り込まれた放射性同位体を含むアミノ酸が、軸索輸送によって、直接 SCN に到達することを明らかにした⁶。

これらの形態学および生理学的研究により、SCN がリズム発振の中枢であり、また、光同調の主要な部位であるという概念が形成されたのである。

3. SCN の脳機能に及ぼす影響

これら海外の研究に劣らず、日本の研究者も優れた成果を上げている。三菱化成生命科学研究所の Nobuo Ibuka & Hiroshi Kawamura は脳機能に着目して研

✉ okamura.hitoshi.4u@kyoto-u.ac.jp

究を進め、1975年にSCN破壊による睡眠覚醒リズムの消失を脳波計測により報告した⁷。これは、睡眠がSCNにより日周制御されていることを示す初めての研究であった。

次に、SCN細胞自身の何が変動してリズムを起こすのかが大きな関心となった。William Schwartzらは、1977年に放射性同位元素で標識したdeoxyglucoseの取り込みが、脳で唯一SCNだけで明瞭な昼夜差として現れることを示した⁸。これは、SCNの細胞のエネルギー代謝が、他の脳部位では見られないほど強い変動を示すことを意味していた。

その2年後の1979年、Shin-ichi Inouye & Hiroshi Kawamuraは、ラットSCNの周囲をハラスナイフでカットし、SCNを含むその内部(island)では神経細胞のスパイク活動に概日リズムがあるが、その外部ではその概日リズムが消失することを報告した⁹。これは、SCNの神経活動にリズムがあるが、他の脳部位の概日リズムは、SCNとの連絡を切り離すと消失することを示した重要な研究であった。

4. VIPの定量的組織化学法の確立

では、実際に脳内でどんな物質がSCNのリズム産生に関与しているのであろうか？1980年はその同定に多くの研究者が挑戦することとなった。当時は、おびただしい数の「脳腸ペプチド」(神経ペプチド)が発見され、それらが研究の対象となった。

筆者が取り組んだのは、免疫組織化学や*in situ* hybridizationの手法によって、SCNという1mmにも満たない小神経核にあるvasoactive intestinal peptide (VIP)の昼夜変動を明らかにすることであった。ただ、組織化学という手法は本質的に定性的であり、定量には向いていなかった。そこで、数年かかって定量性に取り組み確立したのが「定量的組織化学」である。これで、昼夜差が2倍にも満たないVIPペプチドとVIP mRNAの24時間リズムを明らかにした。本稿では割愛するが、この時に苦勞して確立した、非常にシンプルで誰もが再現可能な、数百枚以上のSCN前額断切片を用いて画像解析で計測する「定量的組織化学法」が^{10,11}、その10年後の1997年にSCNにおける*Per1*遺伝子の発現解析に威力を発揮するとは、当時は知る由もなかった。

5. SCNはヘテロな細胞の集合体である

世界中の多くのラボでなされたペプチド含有細胞の形態学的解析の結果、1990年には、SCNにはVIP、GRP、バソプレッシン、ソマトスタチン、プロキネチ

シン2(このペプチドの発見は2000年以降だが)が独立した細胞系として存在し、SCNがこのヘテロな神経細胞の集合体であることが明らかとなった。しかも、これらはすべてがGABA作動性である。さらに、照射後には、SCN腹側部の細胞にのみ、immediate early gene (IEG)である*c-Fos*や*c-Jun*が急速に(1時間以内)発現誘導されることが分かった。

これらの研究により、既に1990年に至るまでに、時計中枢であるSCNは、時計発振に重要な背側部分と、光入力を受け同調に関与する腹側部との、少なくとも2部位に分かれるヘテロな細胞集団で構成されると考えられるようになった。

6. SCNはスライドガラス上でもリズムを刻む

1991年、Keiko Tominaga, Shin-ichi Inouye, Hitoshi Okamuraは、脳の外に取り出したSCNスライスをガラススライド上で培養するという手法を開始し、培養液中にバソプレッシンが24時間周期で分泌されることを報告した¹²。すなわち、SCNのバソプレッシンニューロンは、脳から完全に離れた状況下でもその細胞特性が変わらず、バソプレッシンを周期的に放出し続けるのである。睡眠や記憶形成などで脳機能がはたらくときは、さまざまな脳部位が相互に影響しあうことが必要であるが、驚いたことに、概日リズムは全く異なり、SCNという微小な神経核だけで生み出されることである。

7. 哺乳類でも、ハエやカビと同様に、遺伝子レベルでリズムは生まれる可能性

哺乳類のリズム研究が始まったのと同じころ、ショウジョウバエでも生体リズムの研究が始まり、蛹が成虫となる羽化が朝のみに起こることが、既に観察されていた。Seymour Benzerは、行動を規定する遺伝子があるはずと考え、ショウジョウバエを研究対象にフォワードジェネティクスを創始し、1971年*period*遺伝子座を突き止めた。この研究は、Jeffrey C. Hall、Michael Rosbash、Michael W. Youngの1984年の時計遺伝子*period*の発見に結実した。少し遅れて、Jay Dunlapによりアカパンカビ時計遺伝子*freq*も同定され、概日時計は遺伝子で規定されるということが解ってきた。

哺乳類ではどうであろうか？1988年、Martin RalphとMichael Menakerは、20時間周期のフリーランリズムを示す突然変異の*tau*-mutantハムスターを報告した¹³。さらに、*tau*-mutantハムスターのSCNを取り出し、SCNを破壊した24時間周期の野生型ホ

ストハムスターに移植すると、20 時間周期で動き始めた¹⁴。この実験により、哺乳類の体内時計も遺伝子に規定され、しかも、SCN の遺伝子発現により動いている可能性が高くなった。

ならば、哺乳類の体内時計遺伝子を同定しよう、という機運が高まった。1994 年、Joseph Takahashi は、ショウジョウバエで Benzer らが行ったように、哺乳類でフォワードジェネティクスを展開しスクリーニングの結果、*Clock* 変異体を発見・報告した¹⁵。

8. SCN で 10 倍昼夜変動する *Per* との出会い：

哺乳類とショウジョウバエのリズム研究の結合

阪神・淡路大震災直後の 1995 年春、筆者は神戸大学医学部に研究室を持つことになった。これまでの記載により明らかなように、1990 年代初頭には SCN の生理学的、解剖学的研究は一種の飽和点に達していたが、カギになる時を刻む物質とそのメカニズムは全くわかっていなかった。当時筆者は、カギになる物質があるなら、生体リズムの中樞である SCN にあるに違いないと考え、これまで疎遠だった分子生物学を取り入れ、なぜ朝めざめ、夜眠くなるのか、その答えとなる物質を探し出すことに研究目標を絞った。そのために参加してくれた研究者は、Yasufumi Shigeyoshi, Toru Takumi, Kazuhiro Yagita, Shun Yamaguchi, Satoru Masubuchi であり、各自が得意な研究手法で SCN の研究を開始してくれた。

一方、1990 年より世界中の研究者が参加した生命科

学の一大プロジェクトであるヒトゲノムプロジェクトが開始された。これから述べる哺乳類の時計遺伝子 *Per* の発見に携わった Yoshiyuki Sakaki, Hajime Tei, Cheng Chi Lee は、いずれもヒトゲノム研究の領域出身であった。

筆者がラボを立ち上げた一年後の 1996 年のある日突然、日本を代表するヒトゲノム研究者の東京大学 Yoshiyuki Sakaki, Hajime Tei から、ハエ *period* のホモログと思われるものに関する共同研究の提案があった。それは面白い。仮に生体リズムと関係があるならば SCN に有るか無いかは鍵になると考え、先に述べた SCN の定量的組織化学の手法を用いて *period* ホモログ (後の *Per1* 遺伝子) の発現を検討した¹⁶。

この *period* ホモログは、これまで経験したことのない奇妙な遺伝子であった。これまで検索してきた SCN のペプチドや受容体の遺伝子は、24 時間リズムを刻むものはあるが、せいぜい 2 倍程度の変動であった。ところがこの *period* ホモログである *Per1* は 10 倍かそれ以上の変動を示す。すなわち、ピーク時は強く発現するが、反対位相時にはほとんど発現が検出できないのである。

この哺乳類 *period* ホモログは、まさに Hall と Rosbash が観察した、ショウジョウバエの視葉における *period* と同じように、極めて大きな昼夜変動を示す遺伝子だったのである¹⁷。2017 年のノーベル賞受賞の要因の一つは、*period* 遺伝子の単離だけでなく、その昼夜の著明な発現差から考え出された転写・翻訳フィ

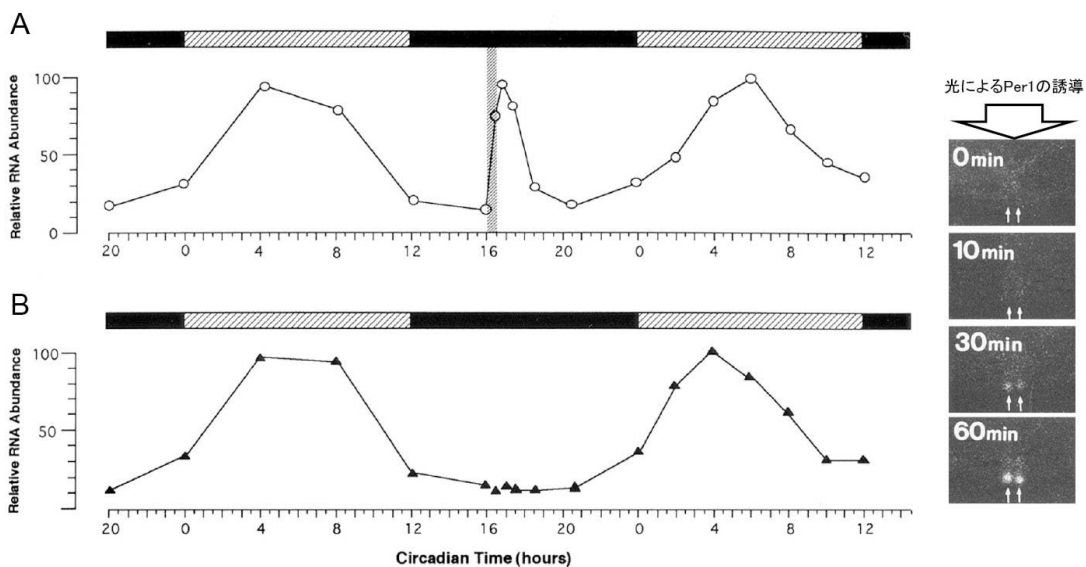


図 1 *Per1* mRNA のマウス SCN での定量的組織化学法による 24 時間リズムと、光による *Per1* の急性誘導行動リズムの位相を後退させる夜の前半 (CT16) に光パルスを与えると、*Per1* が強く SCN に誘導される。(B) の光にさらされていない個体に比べると、(A) の光を照射したマウスの *Per1* mRNA リズムが次の日に既に後退していることに注目。各点 2 例の平均値を示す。右側に示すのは、CT16 の時、光を 30 分間照射。文献²⁰より改変

ードバックループ (Transcription Translation Feedback Loop: TTFL)、すなわち、時計遺伝子がネガティブ因子として自身の発現を抑制するという生物一般に共通する振動機構の提唱にある。なんと、彼らがそのきっかけとなる *period* の時間特異的な発現を観察したのも、1988 年のハエ頭部の免疫組織化学の組織切片からである¹⁸。

この *Per1* の成果は、哺乳類もハエも基本は同じ原理で駆動するのではないか、という流れを作った。事実、哺乳類初の時計遺伝子である *Clock* に相当するハエの *dclock*、ハエの *cyc* に相当する哺乳類の *Bmal1*、ハエの *doubletime* に相当する哺乳類 *CK1 δ* 、*CK1 ϵ* が 2-3 年で次々と単離された。哺乳類とハエの時計遺伝子研究は相乗的に進むことで、TTFL を構成する哺乳類の時計遺伝子はすべてそのカウンターパートがハエにもあることが解明された。時代が動いたのである。この一連の研究はついにヒトの睡眠覚醒異常の発見に至る。2001 年の Luis Ptacek と Ying-Hui Fu による FASPS (家族性睡眠相前進症候群) の患者のゲノム解析より、これらヒトの睡眠覚醒異常と TTFL の関係が明らかとなった¹⁹。すなわち、1971 年にショウジョウバエの *period* 変異体から始まった研究は、30 年を経てヒトの疾患の原因解明につながったのだ。

9. *Per1* の光によるインダクション

SCN には、24 時間のリズムをつくるという機能だけでなく、そのリズムを外界の明暗周期に同調させるという機能がある。我々が得意とする SCN の定量的組織化学を用いて *Per1* の発現量を解析すると、24 時間の発現リズムだけでなく、夜間に光を照射することにより *Per1* が 1 時間以内に急速に SCN に誘導される

ことを発見した (図 1)。通常 *Per1* は夜にはほとんど発現していないが、光を照射すると瞬時に昼の時間帯と同じレベルに発現することが分かったのである。これにより、ショウジョウバエが TIM を介したタンパク質レベルで、外部環境に対するリズムの同調 (リセッティング) を行うのに対し、哺乳類では *Per* 自身のインダクションという急速な遺伝子発現で対応していることが明らかとなった²⁰。しかも、たった一回、短時間の光を照射するだけで、*Per1* 発現のリズム位相は次の日から動いたのである。

10. SCN とおなじ TTFL が全身にある : 細胞時計の TTFL

遺伝子の発見をきっかけに、生物時計の研究は、全くそれまで予測もされなかった方向に発展することになる。スイスの Ueli Schibler らは、血清刺激で線維芽細胞系の *Per1* 遺伝子がリズムを刻み始めることを明らかにした²¹。この画期的な発見は、リズムが SCN という一部の細胞に限局した特殊な現象ではなく、全身の細胞でも、その活動を制御する普遍的な現象であることを示している。最近、Schibler が当時の研究を振り返り、この線維芽細胞における現象の発見のヒントとなったのは、私たちによる SCN における *Per1* 遺伝子の急速な光誘導の報告である、と述懐しており²²、その意外な影響に驚いている。

私たちは、この線維芽細胞系を用いて、時計遺伝子が SCN でも線維芽細胞でも同じ TTFL 機構を用いてリズムを発振していることを明らかにした。この研究で、時計遺伝子の形成する TTFL が脳の SCN だけでなく、その他の約 37 兆個の細胞全てに発現しているということが分かったのである²³。

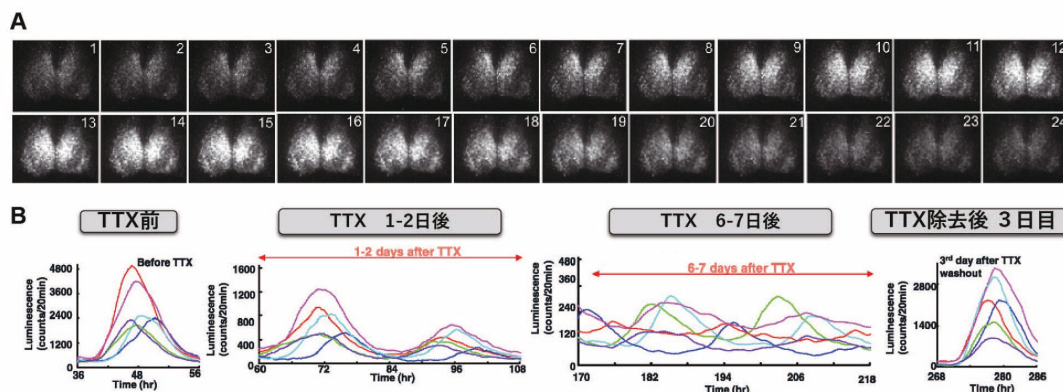


図 2 (A) *Per1*-promoter-*luciferase* トランスジェニックマウス SCN スライスカルチャー シングルセルレベルでの時計発振が、SCN の背側より起こり初め、14 時間後には SCN の中央部の細胞が強く *luc* を発現し、やがて減弱する。数字は時間を示す。(B) TTX 投与による細胞間リズム乖離 個々の SCN 細胞のリズム振幅も減弱する。TTX を除去すると、個々の細胞のリズムの振幅が回復するだけでなく、SCN 全体のロバストナリズムも回復する。文献²⁴より改変

った (図 2B) ²⁴。これは、SCN 全体として発振されるリズム (振幅、周期や位相決定) が単一の細胞の発振リズムだけで決まるのではなく、細胞間の相互作用が影響を及ぼし頑強なリズムを生み出すことを示している。これは、TTFL を超えた、神経回路レベルでの制御が SCN リズム発振には重要であることを示している。

14. SCN-Gene Project: 多様なリズム異常マウスの作出

2007 年、筆者は京都大学薬学研究科に研究の場を移した。そこに参加してくれたのは、Masao Doi, Yoshiaki Yamaguchi, Jean-Michel Fustin で、SCN の回路の解析から各種疾患に及ぼす生体リズムの研究に取り組んでくれた。

まず、SCN の回路制御に重要なファクターを探すことにした。具体的に何がリズム形成に関与するのかを検索するため各種薬剤投与を行ったところ、百日咳毒素 (PTX) 投与を行った群において、TTX とほぼ同じ効果を認めた ²⁸。これは、SCN 各細胞リズムの形成に *Gi/o* タンパク質を介するシグナル伝達が重要であることを示している。

さらに、私たちは SCN の神経回路を物質的に網羅的に解析するプロジェクト (SCN-Gene Project: SCN に特異的に発現する遺伝子を網羅的に組織化学で同定し、リズムに及ぼす影響をノックアウトマウスで検出する) を進めた ²⁹。興味深いことに、このプロジェクトで作製した遺伝子改変マウスでは、リズム周期異常、睡眠相後退症候群 (DSPS)、光感受性異常、時差症候群の異常など、様々なタイプの睡眠覚醒リズム異常が極めて高率で発現することが分かった。これらの遺伝子は時計遺伝子のように末梢臓器にも普遍的に見られるものでなく、SCN に特異的に発現し、その機能に関わっているものであった。この結果は、近年急増してい

る概日リズム異常性睡眠障害 (Circadian rhythm sleep disorders) には、SCN の機能異常が深くかかわっていることを示唆している。

15. 目覚ましタンパク質 RGS16 は cAMP を介して働く

SCN-Gene Project により見つけた遺伝子の中に、SCN に特異的に発現する Clock Controlled Gene である「目覚まし遺伝子」*Rgs16* がある ²⁸。一般に、G タンパク質は GDP-GTP 交換反応により活性型となり、自身の GTPase 活性により不活性型となるが、近年この GTPase 活性を制御する一群の RGS (Regulator of G-protein signaling) の存在が注目されている。

この仕組みを簡単に説明すると、SCN の細胞は、夜明け前、細胞内の TTFL のポジティブ因子である CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーの刺激で *Rgs16* を発現させ、*Gi/o* を不活性化する。それにより *Gi/o* に抑制されていた Adenylate cyclase が活性化し cAMP 産生が増大し、活性化 CREB が核内で時計遺伝子 *Per1* プロモーターの CRE 部位に結合し、時計遺伝子を誘導し、細胞の時間を早める。実際、*Rgs16* をノックアウトすると朝の cAMP 増大および CRE シグナル伝達は消失し、SCN の *Per* の立ち上がりのリズムは遅れてしまう (図 3) ²⁸。

SCN が多くのヘテロな細胞集団からなることは、ペプチドニューロンの分布の違いや神経入力の有無などの研究からよく知られているが、これら細胞間の相互カップリングの実体解明については未だ研究途上である。最近、一連の AAV ベクターを用いた SCN スライスカルチャーの研究が英国の Hastings グループによって進められている ³⁰。これらの努力により、SCN の独自性の謎の一端は解明されるであろう。

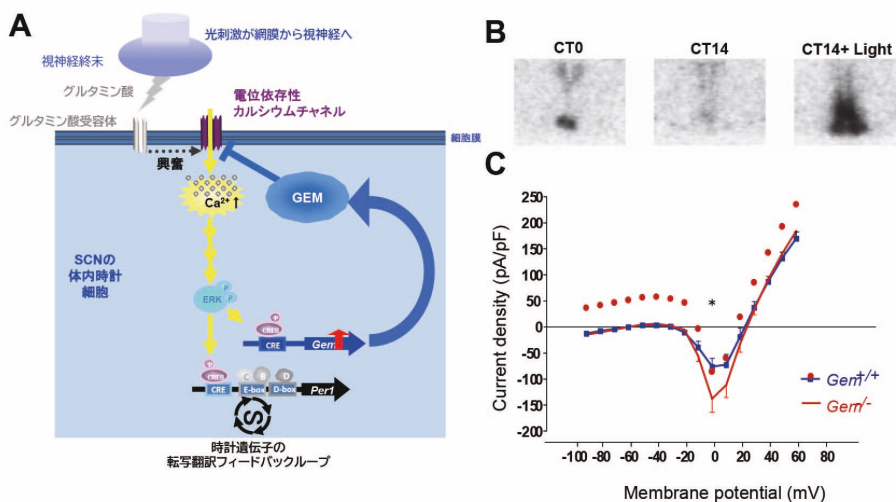


図 4 光による低分子量 G タンパク質 Gem の誘導 (A) GEM は VDCC の活動を直接抑制し、カルシウムイオンの流入を抑制する。

(B) CT14 における光パルスは Gem を誘導する。(C) ホールセルパッチクランプ法による SCN 細胞の Ca^{2+} 電流 Gem ノックアウトマウス ($Gem^{-/-}$) では、膜電位付近の Ca^{2+} 電流が、野生型マウス ($Gem^{+/+}$) に比べて、優位に増大していた。文献 ³¹ より改変

16. 光で SCN に誘導される低分子量 G タンパク質は VDCC からのカルシウムイオンの流入を直接抑制する

SCN 内の回路だけでは、SCN のリズム発振や同調の機構の全貌は解明できない。光同調に関しては、光照射により immediate early gene (IEG) である c-Fos や c-Jun が急速 (1 時間以内) に、網膜視床下部路の入力を受け VIP 細胞などが分布する SCN 腹側部の細胞に誘導されることが、1990 年のはじめを賑わせた重要なトピックであった。

最近、筆者らは、もう一度生体レベルに戻って、SCN の機能を振り返ろうとしている。Keiko Tominaga との共同研究を通して、IEG の一つである低分子量 G タンパク質である GEM が、光により、腹側部の SCN で誘導され、GEM タンパク質自身が直接、電位依存性カルシウムチャンネル (VDCC) に働きかけ、カルシウム電流を減少させることを明らかにした (図 4) ³¹。

眼球に入る光情報は網膜で受容され、視神経を介して SCN に到達する。この時、光情報は神経終末からのグルタミン酸の放出に変換され、SCN のグルタミン酸受容体を活性化する。夜間、時計細胞はこの光刺激を受けて興奮し、VDCC が開き、細胞外からカルシウムイオンが細胞内に流入する。このシグナルは、核内のクロマチンリモデリング、CREB のリン酸化により CRE の活性化、時計遺伝子 Per の転写促進へとつながり、最終的に体内時計の位相を変位させる。SCN を活性化する光シグナルは同時に、Gem の発現も促進し、生成した GEM が VDCC の抑制因子となってカルシウムイオンの流入を抑制する。これにより、過剰な体内時計の位相変位が防止されるというわけだ。この GEM による制御機構が、光によるリズムの位相変位が約 3 時間と限界がある理由の一つとなりうると考えている。

17. おわりに

SCN を SCN たらしめているものは何か? SCN は通常の脳の神経核と同様、ニューロン、グリア、そして毛細血管から構成される。SCN のニューロンは小型で (脳内で最も小さい細胞の一つ)、片側で約 1 万個が密に詰まっている (脳内で最も密な神経核の一つ)。それらは、同じ神経核内の隣接するニューロンとの相互に強固なシナプス結合により局所回路を形成する。また、各々のニューロンは、周囲の大部分を薄いグリア細胞の突起で覆われている。

もう 30 年前になるが、Dale Edgar と William Dement は、昼行性霊長類であるリスザルの SCN を破壊すると、覚醒時間が減少することを発見した ³²。

これは、齧歯類の SCN では想定されていなかった現象である。現在もまだ、SCN と昼行性・夜行性の関係、睡眠覚醒との関係も、神経回路のレベルでも、分子レベルでもはっきりとは分かっていない。SCN は脳内でもとりわけ小さな神経核だが、いまだ多くの謎が残されており目が離せない。

参考文献

- 1 Klein, D.C., Moore, R.Y., & Reppert, S.M. *Suprachiasmatic nucleus* (Oxford University Press, 1991).
- 2 岡村均 時計遺伝子 からだの中の「時間」の正体 (講談社ブルーバックス, 2022) .
- 3 Schwartz, W.J. & Daan, S. *Origins: A brief account of the ancestry of circadian biology.* in *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (ed Kumar V) Ch.1, 3-22 (Springer, 2017).
- 4 Stephan, F.K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 1583-1586 (1972).
- 5 Moore, R.Y. & Eichler, V.B. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesion in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-6 (1972).
- 6 Moore, R.Y. & Lenn, N.J. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* **146**, 1-14 (1972).
- 7 Ibuka, N. & Kawamura, H. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res.* **96**, 76-81 (1975).
- 8 Schwartz, W.J. & Gainer, H. Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* **197**, 1089-1091 (1977).
- 9 Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 5962-5966 (1979).

- 10 Takahashi, Y. *et al.* Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res.* **497**, 374-377 (1989).
- 11 Okamura, H. *et al.* Circadian change of VIP mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus following p-chlorophenylalanine (PCPA) treatment in constant darkness. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **29**, 358-364 (1995).
- 12 Tominaga, K., Inouye, S.I. & Okamura, H. Organotypic slice culture of the rat suprachiasmatic nucleus: sustenance of cellular architecture and circadian rhythm. *Neuroscience* **59**, 1025-1042 (1994).
- 13 Ralph, M.R. & Menaker, M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* **241**, 1225-1227 (1988).
- 14 Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978 (1990).
- 15 Vitaterna, M.H. *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719-725 (1994).
- 16 Tei, H. *et al.* Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* **389**, 512-516 (1997).
- 17 Hardin, P.E., Hall, J.C. & Rosbash, M. Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* **343**, 536-540 (1990).
- 18 Siwicki, K.K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbash, M. & Hall, J.C. Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* **1**, 141-150, 1988.
- 19 Toh, K.L. *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043 (2001).
- 20 Shigeyoshi, Y. *et al.* Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**, 1043-1053 (1997).
- 21 Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929-937 (1998).
- 22 Schibler, U. Getting surprising answers to unasked questions. *Cell* **169**, 1162-1167, (2017).
- 23 Yagita, K., Tamanini, F., van der Horst, G.T.J. & Okamura, H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292**, 278-292 (2001).
- 24 Yamaguchi, S. *et al.* Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**, 1408-1412 (2003).
- 25 Yamaguchi, S. *et al.* View of a mouse clock gene ticking. *Nature* **409**, 684 (2001).
- 26 Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685 (2000).
- 27 Ishida, A. *et al.* Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* **2**, 297-307 (2005).
- 28 Doi, M. *et al.* Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.* **2**, 327, (2011).
- 29 Okamura, H. Suprachiasmatic nucleus clock time in mammalian circadian system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**, 551-556, (2007).
- 30 Patton, A.P. *et al.* The VIP-VPAC2 neuropeptidergic axis is a cellular pacemaking hub of the suprachiasmatic nucleus circadian circuit. *Nat. Commun.* **11**, 3394 (2020).
- 31 Matsuo, M. *et al.* A light-induced small G-protein gem limits the circadian clock phase-shift magnitude by inhibiting voltage-dependent calcium channels. *Cell Rep.* **39**, 110844 (2022).
- 32 Edgar, D.M., Dement, W.C., Fuller, C.A. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *J. Neurosci.* **13**, 1065-1079 (1993).

ファブ・ファイブ論文からの視交叉上核研究展開

中村 渉^{1,✉}, 高須 奈々¹, 中村 孝博²

1 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 加齢口腔生理学分野、2 明治大学 農学部 動物生理学研究室

今年 2022 年は哺乳類におけるサーカディアンペースメーカーとして視交叉上核が同定されてから 50 年の節目にあたる。著者は視交叉上核発見 25 周年の 1997 年に、培養視交叉上核組織から生理機能活性のサーカディアンリズムを記録する手法の手ほどきを受けて時間生物学研究を開始した。はからずもその年は哺乳類の時計遺伝子フェーズ元年にあたり、時計遺伝子のクローニングに関する論文が国内外から相次いで公開された。当時、新規クローニングされた遺伝子が視交叉上核で強く発現していることが時計遺伝子として認識される必要条件となっていたことは、すでに時計中枢としての視交叉上核が確立されていたことを示している。本稿では、著者が視交叉上核研究に出会う以前に公表された 5 編の論文（ファブ・ファイブ論文：Fabulous Five Papers）を提示し、ポスト時計遺伝子世代の立場から、視交叉上核研究の展開について概説する。

1. A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. (1976)¹⁻⁵

1976 年に *Journal of Comparative Physiology* 誌 106 巻 3 号に掲載された 5 編の論文¹⁻⁵は総ページ数 133 頁に及ぶ。Pittendrigh と Daan によって書かれたこの名著に対して、本稿著者の独断によりポップな“ファブ・ファイブ論文”に選定することはあまりにもおこがましい。しかしながら、本稿における「原点」と

して、哺乳類のサーカディアンペースメーカーの実体が同定された年代に公表されたこれらの論文を挙げることにする。一連の論文では、4 系統の夜行性齧歯類；*M.auratus*（ハムスター）、*P.leucopus*（シロアシネズミ）、*M.musculus*（ハツカネズミ）、*P.maniculatus*（シカネズミ）をモデル動物に用い、輪回し行動リズムを指標として比較生理学的観点からサーカディアンリズムの機能解析をおこなっている。解析パラメーターは

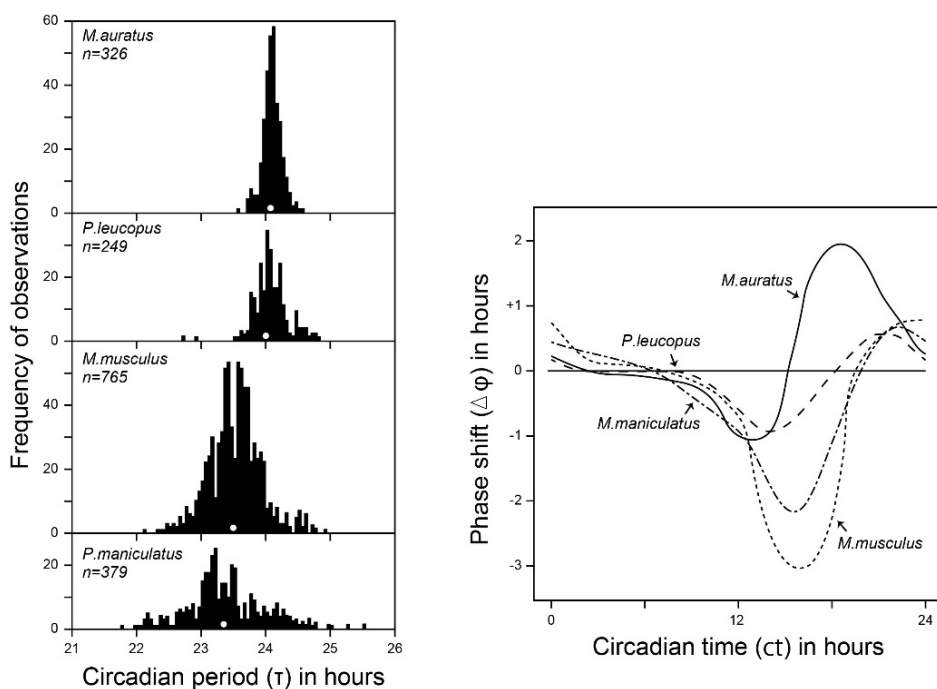


図1 夜行性げっ歯類（4 系統）のサーカディアンペースメーカー機能特性
（左）恒常暗環境下における輪回し行動リズムの自由継続周期分布をヒストグラム表示している。○は系統内平均周期を示す。
（右）輪回し行動リズムの 15 分光パルスに対する位相反応曲線。
文献^{1,2}より引用

✉ wataru_nakamura@nagasaki-u.ac.jp

恒常環境下における自由継続周期と単発光パルスに対する位相反応性である(図1)。輪回し行動リズムの長期安定記録の特性を活用し、恒常暗(明)、重水投与、光照度、履歴効果、加齢等の要素を比較検討して“サーカディアンペースメーカー”の機能を見事に体系づけた。この論文で記述される“pacemaker”の実体は明らかにされていない。しかし、一連の論文を総括する最終章「V. Pacemaker Structure: A Clock for All Seasons」⁵のなかで“The recent work⁶⁻⁸ leaves little doubt that our pacemaker is neural and probably located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus.”の記述がある。本稿著者自身が視交叉上核研究を開始した1997年にはすでに公表されていたこれらの論文は、その後の研究において視交叉上核に関する論文をまとめるたびに読み返し、その都度目からうろこが落ちるような発見がある。本来、実験計画時点で想定しておくべきであろうが、実際に得られた実験データをもとに論文を読み返すことで解釈が深まるということは、自身の視交叉上核研究の「原点」であり「原典」と呼ぶにふさわしいといえる。

2. Nucleus Suprachiasmaticus: The Biological Clock in the Hamster? (1976)⁹

視交叉上核の実験的破壊により、輪回し行動と飲水行動⁶、副腎コルチコステロン含有量⁷、松果体セロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ活性⁸、睡眠-覚醒リズム¹⁰、摂食タイミング¹¹等、様々な動物個体生理機能のサーカディアンリズムが消失することが報告された。とりわけ目を引くのが視交叉上核の学名(ラテン語名)を冠したこの論文⁹である。StetsonとWatson-Whitmyreは論文の冒頭で、ハムスターにおいてよく研究されているサーカディアンリズムとして、輪回し行動・発情周期・光周性の三つの事象を挙げている。論文のタイトルが、「視交叉上核:ハムスターの生物時計なのか?」と疑問符がついており断定的ではないことも興味深い。実験的破壊によりこれらの周期性が消失することをもって視交叉上核=生物時計とよいか注意深く考察を加えている。それでは、そもそもげっ歯類では通常4日間周期である発情周期が「サーカディアンリズム」であるとはどういうことだろうか。雌性げっ歯類の場合、発情周期は排卵周期と一致しており、卵胞の成熟とそれに応じたエストロゲン濃度の上昇が視床下部-下垂体-性腺(卵巣)-軸の制御により排卵前黄体化ホルモン(LH)のサーージ状分泌を引き起こし、4日間の排卵周期をもたらす。EverettとSawyerは5:00-19:00明期/19:00-5:00暗期の14時間:

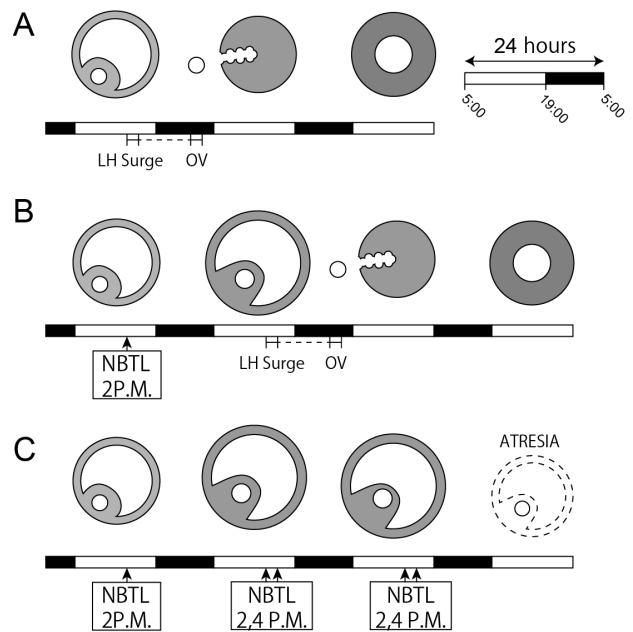


図2 排卵を引き起こすクリティカルな「時間窓」

(A) 4日性周期を示すラット卵胞の模式図。くり通常LHサーージ状分泌の時間、排卵(OV)の時間は規定されている。

(B) 特定時刻のネプタール(NBTL)処置により、その日の排卵はスキップし、翌日に持ち越される。

(C) 特定時間帯(時間窓)前後に連日NBTL処置をおこなうことにより、排卵は生じず閉鎖卵胞となる。

文献¹³より引用

10時間明暗サイクルで飼育した雌性ラットに対して発情前期の14:00にネプタールを投与することにより、続く真夜中に排卵がなされず翌日も発情前期が継続することを明らかにした(図2)。一方、16:00に同様の処置を行った場合、同夜間に排卵が生じており、排卵を引き起こすためにクリティカルな「時間窓」のコンセプトを提唱している¹³。さらにSawyerらは卵巣摘出を施術した雌性ハムスターにエストロゲンカプセルを埋入し血中濃度を高値に保った場合、連続して3日間毎日15:00にLHサーージ状分泌が生じることを報告した。これらの結果は、性周期は卵胞成熟により十分なエストロゲン濃度に達するために必要な絶対時間(>96時間)で規定されると共に、生物学的な1日の時刻依存的な「タイミングシグナル」が排卵前LHサーージ状分泌をトリガーしていることを示している¹⁴。またFitzgeraldとZuckerは、恒常薄明下における雌ハムスターは、輪回し行動の自由継続周期が延長するのに伴い、発情周期は輪回し行動開始位相と一定の位相角差を維持しながらサーカディアンDay×4サイクル(>96時間)の周期性を示すことを報告した。この発情行動開始と輪回し行動との位相角差は、飲水中の重水投与により自由継続周期を延長させた場合も維持されており、複数のサーカディアン振動体による共役制御が示唆される¹⁵。光周性動物である雌性ハムスタ

一は、恒常暗環境下で光感受性位相に光入力を得られない場合、性周期が消退し腫上皮組織像は発情休止期に固定される。一方、視交叉上核破壊による性周期消退後の腫上皮組織像は角化上皮細胞が顕著な発情期に固定された。この論文では⁹、さらなる検証が必要であると断った上で、視交叉上核はハムスターの「生物時計」であると結論している。

3. Multiple Circadian Oscillators Regulate the Timing of Behavioral and Endocrine Rhythms in Female Golden Hamsters (1985)¹⁶

雌性げっ歯類におけるサーカディアンペースメーカー（視交叉上核）、輪回し行動、そして性周期を関係づけるうえでユニークな実験結果を提示するのがこの論文である。Swann と Turek は雌性ハムスターを長期間恒常明環境下におき輪回し行動が反対位相で二度生じる“Split”した状態にあるとき、LH サージも1日に二度起きる Split Surge を呈することを報告した¹⁶。これ以前に Turek らは輪回し行動 Splitting ハムスターの片側視交叉上核を破壊することによって、一方の輪回し行動リズム構成要素が消失し、単相行動リズムに収束することを明らかにしていた¹⁷。さらに、de la Iglesia らは行動 Splitting 時の視交叉上核冠状断組織切片を作成して時計遺伝子の発現を検証したところ、左右の視交叉上核に偏在する概日リズムを明示した¹⁸。行動リズムの Splitting 現象はサーカディアンペースメーカーを構成する Evening (E) 振動体と Morning (M) 振動体との相互共役で説明される⁵。ややもすると左右の視交叉上核がそれぞれE振動体とM振動体であるとの結論に至るかもしれないが、そうではなかった。本稿著者らはラット新生仔の視交叉上核冠状断組織切片を多電極培養皿上で培養し、電極上に載った複数の神経細胞から同時に連続的に神経発火頻度のサーカディアンリズムを記録した。その観察において、左右の視交叉上核では大半の神経細胞が同期したサーカディアンリズムを発生する一方、同側の神経核内でも反対位相の発火リズムを示す神経細胞が存在することを見出した¹⁹。また、Davis と Gorski は、片側視交叉上核をあらかじめ実験的に破壊したハムスターでも行動リズムの E 要素と M 要素の乖離が生じることを報告している²⁰。de la Iglesia らの続報は行動リズム Splitting と Split LH サージの関係性を明確に示した。行動リズム Splitting 雌性ハムスターにおいて、視交叉上核および LH 分泌を制御する性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LH-RH) 含有神経細胞の興奮性を組織学的に検証したところ、視交叉上核の片側活動性と共に同

側に局在する LH-RH 含有神経細胞の活動亢進が明らかになった²¹。これらを統合して考察すると、輪回し行動の E 要素と M 要素とをそれぞれ駆動するペースメーカー、HPG-axis 「時間窓」位相をセットする振動体、そして「タイミングシグナル」を出力する振動体、いずれの機能的振動体は片側単一の視交叉上核に内包されていると考えられる¹⁸。行動リズム Splitting の二つの行動要素が反対位相で安定するまでには、E 要素と M 要素とが乖離していく移行期間が認められる。移行期間中に左右の視交叉上核はそれぞれ E 要素と M 要素との位相関係に同調して再構成され、特定の位相関係で安定する⁵。実験的な恒常明条件下とはいえ、左右一対の神経核が交互に活性化し、それぞれが生体レベルで生理機能を制御する、あまりにも美しい事象といえよう¹⁶。

4. Aging alters the circadian rhythm of glucose utilization in the suprachiasmatic nucleus (1988)²²

前述のとおり、HPG-axis の性周期制御に視交叉上核の神経性タイミングシグナルが不可欠であることがわかってきた。Wise らは雌性ラットにおいて中年閉経への移行期間に生じがちな性周期不整が、加齢にともなう視交叉上核の機能変容に起因している可能性について検証した²²。14 時間 : 10 時間明暗サイクル下 (明期 4:00-18:00) で飼育した雌性ラット若齢群 (3-4 カ月齢) と中年群 (12-14 カ月齢) の LH サージを比較すると、若齢群では 17:00-19:00 付近に平時の 10 倍に達する LH サージが確認できるのに対し、中年群では 17:00 に有意な血中濃度の増加が認められるものの上昇レベルは約 2 倍程度にとどまっていた。この経過における視交叉上核の活動性を、放射性ラベルしたグルコース取り込みを指標に検証すると、視交叉上核背側 (SCN-D) および腹側 (SCN-V) における神経活動リズム位相に変容がみられ、加齢に伴い視交叉上核全体として日内リズム振幅の低下がみとめられた。我々は視交叉上核神経活動の加齢に伴う機能変容を検証するため、輪回し行動の同時測定が可能なマウスを対象にして *in vivo* multi-unit neural activity (MUA) 記録法を適用した。視交叉上核研究の歴史的観点からみると、*in vivo* MUA 記録法は Inouye と Kawamura がラット視交叉上核のサーカディアンリズムを記録した卓越した手法である²³。視交叉上核の自律振動性とペースメーカー出力機能を証明するために、*in vivo* 記録に加え島状隔離手術を行っている点は特筆すべきである。Yamazaki らは *in vivo* MUA 記録法をハムスターに適用し視交叉

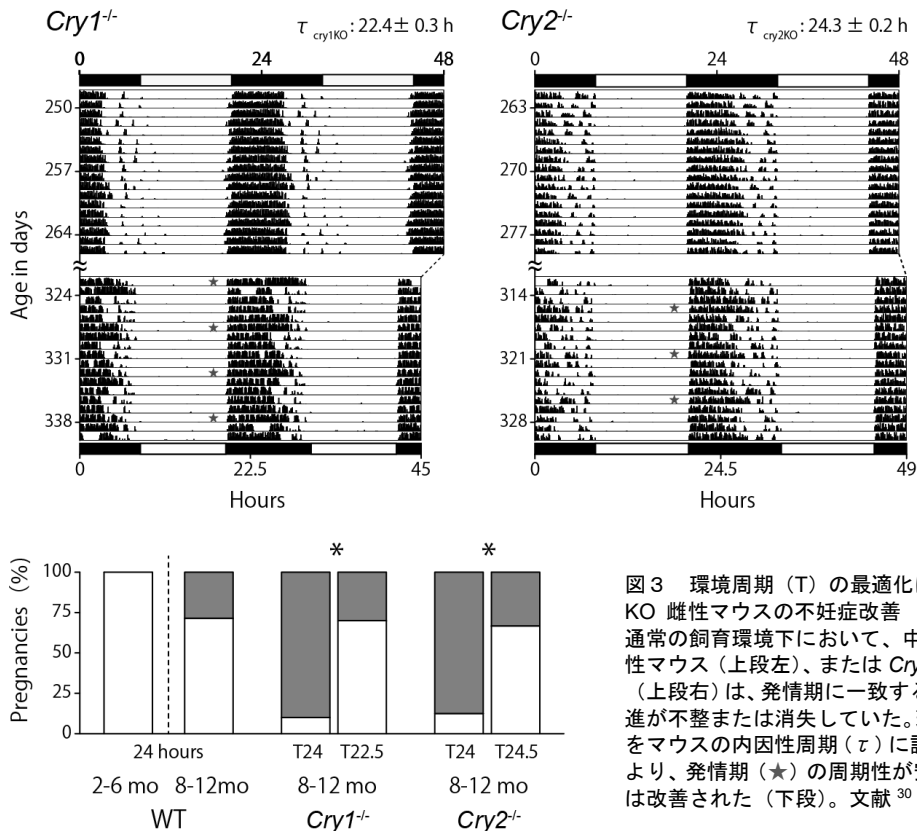


図3 環境周期 (T) の最適化による中年期 Cry KO 雌性マウスの不妊症改善
 通常の飼育環境下において、中年期 Cry1 KO 雌性マウス (上段左)、または Cry2 KO 雌性マウス (上段右) は、発情期に一致する輪回し行動の亢進が不整または消失していた。環境明暗周期 (T) をマウスの内因性周期 (τ) に調和させることにより、発情期 (★) の周期性が安定化し、不妊症は改善された (下段)。文献³⁰より引用

上核と外部神経核領域とのリズム位相関係を解析したが²⁴、当時、本命の標的領域は LHRH 含有神経細胞が散在する内側視索前野であったとのことである。研究プロジェクトは違えども、視交叉上核を対象とした知見はどこかで必ず関連が見いだされるものである。In vivo MUA 記録法は視交叉上核内のリズム位相局在を比較するだけの空間解像度はないものの加齢に伴う機能変容に注目すると、若齢雄性マウス (4 カ月齢) では昼夜差のメリハリがはっきりとした高振幅のリズム変動を示すのに対し、中年雄性マウス (15 カ月齢) では、単位時間当たりの神経発火頻度にばらつきが大きく、視交叉上核としてのリズム振幅は低下することを明らかにした²⁵。さらに発光レポーターイメージングにより、中年雄性マウス視交叉上核組織切片を観察すると、細胞レベル振動体間相互のリズム位相角差が不安定になっており、視交叉上核総体としてのリズム振幅が減衰していくことが明らかになった²⁶。Wise らの論文で議論されていた LH サージに必須となる視交叉上核からのタイミングシグナルは、数時間の時間窓位相に到達する必要がある。つまり、中年期に生じる視交叉上核の機能変容は、タイミングシグナル位相と時間窓位相にずれを生じやすく、結果として性周期不整を招来するのではないだろうか。この論文²²はコンセプトの

提唱者である Sawyer 博士によって入念に査読されたであろうことが伺える。

5. A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. (1988)²⁷

tau ミュータントハムスターは哺乳類で得られた最初のサーカディアンリズム変異体である。ミュータジェネシス法で人為的に変異を起こしたショウジョウバエの *per* 変異体と異なり、実験動物納入業者からリズム研究用に購入された動物の中に見出された。サーカディアンリズム周期 (τ : τ) が 22 時間と短いことから、通常消灯時刻と共に活動期を開始する野生型ハムスターと比較して、明期のうちに活動が活発になる。著者の拙い研究経験からすると、活動期に入ったげっ歯類の取扱いは難しく、しっぽが短いハムスターは単に保持するだけで困難を極める。勝手な想像であるが、Menaker Lab. に動物が届き、その日の夕方に大学院生 Ralph が飼育ケージに移そうとした時点で、この奇跡のようなリズム変異体は見出されたのかもしれない。*tau* ミュータントハムスターの発見による視交叉上核研究の発展への貢献は枚挙にいとまがない。なかでもミュータジェネシス法によるマウスサーカディアンリズム変異体の大規模スクリーニング²⁸には、リズム特

性として輪回し行動リズムの自由継続周期が大変有効であることを示している。一方、Shimomura と Menaker はホモ接合体 (τ_{ss} ; $\tau=20$ 時間) の光反応性について詳細な行動解析を行い、ユニークな同調特性を明らかにしている²⁹。当時、*tau* ミュータントハムスターの系統維持のために、確実な遺伝型判定は個体行動の自由継続周期しか方法がなかったと推測される。ここでもサーカディアンリズムと性周期、そして光周性のすべてに精通した Menaker Lab. の特性が最大限に発揮された。 τ_{ss} は通常 24 時間周期の明暗サイクル (L/D=14 時間/10 時間) に同調することができない。そこで Virginia 大学の動物舎では常時 τ_{ss} 同士の繁殖ペアを L/D=11.7 時間/8.3 時間の長日条件で飼育することで安定した繁殖効率を得ていた。個人的な感想で恐縮だが、Virginia 大学でこの動物繁殖ストラテジーを聞いたときには思わず感嘆してしまった。しばらく後に、我々は、ホモ接合体同士の繁殖ペアで維持していた *Cry1* KO マウス ($\tau_{cry1\text{KO}}$: 22.4 ± 0.3 時間)、または *Cry2* KO マウス ($\tau_{cry2\text{KO}}$: 24.3 ± 0.2 時間) が、通常十分に繁殖可能な中年期 (8-12 ヶ月齢) に不妊症を呈することを見出した。この時、真っ先に思い出したのは τ_{ss} ハムスターの繁殖ストラテジーである。中年期 (8-12 ヶ月齢) に性周期不整を呈した *Cry1* KO 雌マウスを L/D=11.25 時間/11.25 時間の 22.5 時間明暗サイクル下で、*Cry2* KO 雌マウスを L/D=12.25 時間/12.25 時間の 24.5 時間明暗サイクル下で飼育することにより、性周期不整は劇的に改善し、交配により妊娠が成立することを確認した (図 3)³⁰。

6. おわりに

視交叉上核発見 50 周年にあたり、シルバーアニバーサリー後世代 (ポスト時計遺伝子世代) の筆者は、本来であれば十分に蓄積された知見を踏まえて研究を進展させていくべき立場にある。しかしながら得てして論文検索を主体とするディスカッションは懐古的な記述に偏りがちで、過去の偉大な論文に記述されている範疇を超えることができない。比べることもおこがましいが、本稿の最初に紹介した 5 編の論文における Circadian Pacemakers に関する記述は将来展望が満載されており、後の半世紀に及ぶ視交叉上核研究を明確に方向づけている⁵。視交叉上核の実態解明が進展しサーカディアンリズム表出を単一細胞レベルで観察してみると、それぞれがげっ歯類個体行動解析から得られたような独自の周期と位相反応特性を備えており、多様な振動特性を示す集合体として視交叉上核を構成することにより、生体のあらゆる生理機能に最適な活性位相を設定しているのではないだろうか³¹。Jurgen

Aschoff 先生 of 言葉「to do the right thing at the right time.」³² は、当時から視交叉上核の本質的な位相設定機能を予見している。今後は将来展望豊かな論文を目指し、視交叉上核の生理的時間制御機構の全容解明に貢献していきたい。

参考文献

- 1 Pittendrigh, C.S. & Daan, S. A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol. A* **103**, 223-252 (1976).
- 2 Daan, S. & Pittendrigh, C.S. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol. A* **103**, 253-266 (1976).
- 3 Daan, S. & Pittendrigh, C.S. III. Heavy water and constant light: Homeostasis of frequency? *J. Comp. Physiol. A* **103**, 267-290 (1976).
- 4 Pittendrigh, C.S. & Daan, S. IV. Entrainment: Pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol. A* **103**, 291-331 (1976).
- 5 Pittendrigh, C.S. & Daan, S. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J. Comp. Physiol. A* **103**, 333-355 (1976).
- 6 Stephan, F.K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**, 1583-1586 (1972).
- 7 Moore, R.Y. & Eichler, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206 (1972).
- 8 Rusak, B. & Zucker, I. Biological rhythms and animal behavior. *Annu. Rev. Psychol.* **26**, 137-171 (1975).
- 9 Stetson, M.H. & Watson-Whitmyre, M. Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? *Science* **191**, 197-199 (1976).
- 10 Moore, R.Y. & Klein, D.C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* **71**, 17-33 (1974).
- 11 Ibuka, N. & Kawamura, H. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res.* **96**, 76-81 (1975).

- 12 Nagai, K., Nishio, T., Nakagawa, H., Nakamura, S. & Fukuda, Y. Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Res.* **142**, 384-389 (1978).
- 13 Everett, J.W. & Sawyer, C.H. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* **47**, 198-218 (1950).
- 14 Norman, R.L., Blake, C.A. & Sawyer, C.H. Estrogen-Dependent Twenty-four-Hour Periodicity in Pituitary LH Release in the Female Hamster. *Endocrinology* **93**, 965-970 (1973).
- 15 Fitzgerald, K. & Zucker, I. Circadian organization of the estrous cycle of the golden hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 2923-2927 (1976).
- 16 Swann, J.M. & Turek, F.W. Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science* **228**, 898-900 (1985).
- 17 Pickard, G.E. & Turek, F.W. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science* **215**, 1119-1121 (1982).
- 18 de la Iglesia, H.O., Meyer, J., Carpino, A.Jr. & Schwartz, W.J. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* **290**, 799-801 (2000).
- 19 Nakamura, W., Honma, S., Shirakawa, T. & Honma, K. Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 666-674 (2001).
- 20 Davis, F.C. & Gorski, R.A. Unilateral lesions of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J. Comp. Physiol. A* **154**, 221-232 (1984).
- 21 de la Iglesia, H.O., Meyer, J. & Schwartz, W.J. Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *J. Neurosci.* **23**, 7412-7414 (2003).
- 22 Wise, P.M., Cohen, I.R., Weiland, N.G. & London, E.D. Aging alters the circadian rhythm of glucose utilization in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5305-5309 (1988).
- 23 Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 5962-5966 (1979).
- 24 Yamazaki, S., Kerbeshian, M.C., Hocker, C.G., Block, G.D. & Menaker M. Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus *in vivo*. *J. Neurosci.* **18**, 10709-10723 (1998).
- 25 Nakamura T.J. *et al.* Age-related decline in circadian output. *J. Neurosci.* **31**, 10201-10205 (2011).
- 26 Nakamura T.J. *et al.* Age-related changes in the circadian system unmasked by constant conditions. *eNeuro.* **2**, e0064-15.2015 1-10 (2015).
- 27 Ralph, M.R. & Menaker, M. A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. *Science* **241**, 1225-1227 (1988).
- 28 Vitaterna, M.H. *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719-725 (1994).
- 29 Shimomura, K. & Menaker, M. Light-induced phase shifts in tau mutant hamsters. *J. Biol. Rhythms* **9**, 97-110 (1994).
- 30 Takasu, N.N. *et al.* Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light-Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period. *Cell Rep.* **12**, 1407-1413 (2015).
- 31 Pittendrigh, C.S. The photoperiodic phenomena: seasonal modulation of the "day within". *J Biol Rhythms* **3**, 173-188 (1988).
- 32 Aschoff, J. Circadian rhythms in man. *Science* **148**, 1427-1432 (1965).

2022 年 EBRS 体験記@チューリッヒ (スイス)

李 若詩[✉]

筑波大学大学院 人間総合科学研究群 医学学位プログラム 櫻井・平野研究室

筑波大学大学院人間総合科学研究群医学学位プログラム博士課程 3 年、櫻井・平野研究室所属の李です。新型コロナウイルス感染症流行のため、博士課程で海外の学会に参加するのは 2022 年スイスのチューリッヒで開催された European Biological Rhythms Society の学会が初めてとなります。学生の間にも国際学会に参加したいと考えておりましたが、学会参加申請時、大学の方針により学生の海外渡航が制限されていたため、学会の直前まで参加できるか不明な状況で、最終的に参加できたことは本当に幸いだと感じております。今回の学会は本来 2021 年の開催予定でしたが、パンデミックのため、2022 年に延期されました。去年は Trainee Day のみオンラインで開催されました。その Trainee Day に参加したところ、サイエンスだけでなく、キャリアや学習方法など様々な講演を聞くことができ、来年もぜひ学会とともに参加したいと感じ、さらには Trainee Day のオーガナイザーにも加入することになりました。Trainee Day のオーガナイザーは各国の学生や若手研究者で作成されており、Trainee Day の実行や運営に関わっております。

学会期間中、他の学生との交流と経費節約のため、学会が提供したルームシェアシステムを利用して、トルコの博士課程の学生と同じ部屋に泊まりました。お互い初対面でしたが、自然と会話が進みました。

Trainee Day の当日、私はオーガナイザーであったため、自分が担当するセッションの座長と他セッションの手伝いを行いました。昼休みの時間には交流タイムがあり、ランチの後、参加者は同じテーブルにいる 4~6 人の人と会話し、5 分毎に違うテーブルに移動して新しい人と話すイベントを行いました。最初は皆緊張しておりましたが、徐々に空気が和み、みんな楽しく会話しておりました。座長と手伝い以外の時間は講演に参加することができました。本学会とは異なり、Trainee Day はだいぶリラックスした雰囲気、講演者の先生方が自由な形式で様々なトピックについて話してくださいました。先生方がクイズを出し、参加者が答えるという形式の講演や、数名の先生方が集まって参加者と語り合うディスカッション形式のセッションもありました。もちろん、データ解析手法、時間生物の実

験手法などサイエンスのセッションもありましたが、各国の研究状況の紹介の様な学生や若手研究者が気になる役立つ情報を提供するセッションや、国際的にも問題になっている博士学生のメンタルヘルスに関するセッションもありました。参加者たちも楽しく Trainee Day に参加し、活発に討論と交流をしておりました。

Trainee Day が終わった夕方より本学会が始まりました。学会自体は 5 日間に渡り開催されました。分子生物学的機構から、臨床的応用まで、幅広いトピックのシンポジウムがありました。今回の学会では、日本時間生物学会のメンバーが発表する特別なシンポジウムもあり、八木田先生、土居先生、吉種先生など有名な先生方とともに自分の研究について 15 分間紹介する時間を与えていただき、大変貴重で有意義な経験をすることができました。シンポジウムでの発表は初めてだったのですが、会場が穏やかな雰囲気だったためか、案外緊張することなく発表をすることができ、多くの方より質問やアドバイスをいただきました。シンポジウム以外にも、ポスター発表も行いました。有名な先生方が自分のポスターまでいらっしや、30 分間に渡って研究内容について熱く語り合い、自分では気づかなかったデータの特徴や新たな解析の手法などをアドバイスしていただきました。

今回の学会では毎日イベントが何かしらあり、研究以



2022 EBRS Trainee Day オーガナイザー。下段右端は著者で、下段左端が大会長でもある Steven Brown 先生。

✉ s2030405@s.tsukuba.ac.jp



EBRS 夕食会 (Züri Gastro)

外でもチューリッヒや交流を楽しむ機会がありました。学会 2 日目のタンゴショーではみんなが長いテーブルを囲ってスイスの涼しい夕方の風にあたりながら食事し、南米の伝統的なタンゴを鑑賞しました。3 日目は Steven Brown 先生の研究室のメンバーが案内するスイスの様々な人気なレストランで、それぞれの参加者が興味のあるレストランで夕食を楽しむイベント (Züri Gastro) がありました。4 日目の午後は丸々ツアータイムとなっており、ハイキング、湖クルーズ、チョコレート作りやチューリッヒの街ツアーなど豊富な企画の中から選べるようになっておりました。私はチューリッヒ湖のクルーズに参加し、3 時間暖かい太陽にあたりながらチューリッヒのきれいなヨーロッパ風の建築や湖の風景を眺めながら過ごしました。その後はチューリッヒ街ツアーに参加し、街の歴史や特徴について勉強しました。

今回の学会参加は、世界情勢のため航空券が高かつ

たり、大学の許可が下りなかったり、参加をためらうようなこともありましたが、実際参加したところ、想像よりもより大きな収穫がたくさんありました。私の発表を熱心に聞いてくださった方より貴重な指摘をたくさんいただきました。自分の限られた知識や能力では到底気づけなかったようなことにはっと気づかされたことが、この 5 日間だけでも何度もありました。たったの 10 分の会話が新たな可能性を見出すきっかけとなり、次々とアイデアが湧いてきました。そして、何より、多くの国々の研究者と会って語り合うことができました。毎日学会後に知りあつたばかりの様々な国の参加者でおいしいごはんを食べ、研究、生活、将来の話をしたのが何よりの思い出です。学会自体はたったの 5 日間でしたが、その間に新たにできた友人とはその後もつながっており、お互いの研究について議論したり、実験に関してアドバイスしあったり、今後の学会で会ったときもまた懐かしく語り合うことになると思います。

この貴重な経験をするサポートとなってくくださった研究室の先生方、PCR 検査やフライトなど現地で色々お世話になった一緒に日本より学会に参加した方々、また今回の学会の運営に携わっていた方々には深く感謝しております。

この集いに参加させていただき、私は多くの話を聞くことができました。この素敵な経験は今後の研究や生活に良い影響をもたらしてくれると思います。



EBRS 2022 Congress 参加者集合写真

生物リズムに関する札幌シンポジウム 2022 参加して

田母神 さくら[✉]

富山大学 理工学教育部

8月12日から14日まで北海道札幌市で行われた生物リズムに関する札幌シンポジウム2022に参加してきました。私はこれまで、コロナウイルスの影響から、ハイブリッド形式の学会しか参加したことがありませんでした。今回のシンポジウムは初めてのオンラインでの開催だったので、現地で行われるシンポジウムはどのようなものであるか楽しみにしておりました。また、私にとって、初めての英語によるシンポジウムの拝聴、初めてのポスター発表、そして初めての北海道と初めての経験が詰め込まれた3日間でした。

北海道に着いて、はじめにその涼しさに驚きました。富山県の夏は、最高気温が35℃を超える日も珍しくありません。飛行機に乗る前は汗だくだったにもかかわらず、新千歳空港に到着すると気温は22℃しかなく（この日は特に寒かったそうです）、あまりの寒さに体がついていけませんでした。

札幌シンポジウムでは、5つのシンポジウムと6つのレクチャーが行われました。今年の実験者の Amita Shegal 先生の講演は残念ながら直接お聞きすることができず、オンラインでの講演でした。時間生物学の分野の第一線で活躍される先生のお話を聞くことができ、よい刺激を受けました。ほかのどのお話も素晴らしいものばかりでした。個人的には、病気と概日リズムの関係を扱った研究が記憶に残っています。1つは八木田和弘先生の概日時計と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、慢性腎臓病 (CKD) に関する研究です。マウスを通常の光条件下または chronic jet-lag で90週間飼育し、病気への加齢による影響に加えて、概日時計の乱れが病気に関連しているかを解明するという実験では、その飼育期間の長さによって衝撃を受けました。もう1つは、土居雅夫先生の加齢と関連したドライアイの研究です。加齢により弱くなった概日時計の振動を強めることで、ドライアイの治療につながるというお話は大変興味深いものでした。私自身も現在、概日時計と病気との関連性についての研究を進めています。まだまだ、研究は始まったばかりで、実際に社会貢献になる明確なイメージが持てていませんでした。しかし、お

話を聞いて、概日時計と病気との関連性を解明や、概日時計研究成果が実際にヒトへ応用することのリアリティが増しました。社会に貢献できるまでの道筋は決して簡単ではありませんが、目標が明確になりました。

ポスター発表では、つたない発表であるにもかかわらず、多くの先生方に聞いていただき、貴重なアドバイスやご意見をいただきました。議論の中で、答えられない質問が多々あり、自分の知識のなさや至らなさを痛感するばかりでした。以前、研究室での研究発表の練習の際に、先生が「研究発表の質疑応答では、自分の研究のディフェンスができないといけない」とおっしゃられていたのですが、当時の私はあまりピンと来ていませんでした。今回の発表を通して、研究発表におけるディフェンスがどのようなものであるかとその重要性についての理解が進んだように思いました。次回の発表では、もう少しディフェンスができるように、関連する先行研究への理解を深め、精進します。また、非常に幸運なことに Carl Johnson 先生に英語で発表することもできました。カタコトの英語にもかかわらず、最後までにこやかに聞いてくださりました。忘れられない思い出になるとともに、英語がもっと話せるようになりたいと強く感じ、英語学習へのモチベーションが高まりました。

今回のシンポジウムを通して、様々な研究に触れ、自分の視野をより広げて研究を考えることの大切さを感じました。普段、自分の研究分野に近いところにばかり注目していて、視野が狭くなっているように思います。今回幅広い分野のお話を聞いて、視野が広がったように思います。

国内にいながら、一度にこれだけたくさんの方々の時間生物学に関するお話を、国内外の著名な先生方から聞くことができる機会は大変貴重であると思います。今回、札幌シンポジウムに参加して、充実した時間を過ごすことができました。

最後になりましたが、このような素晴らしい会の開催にご尽力いただいた本間研一先生・さと先生、またスタッフの皆様から御礼申し上げます。

✉ m2141315@ems.u-toyama.ac.jp



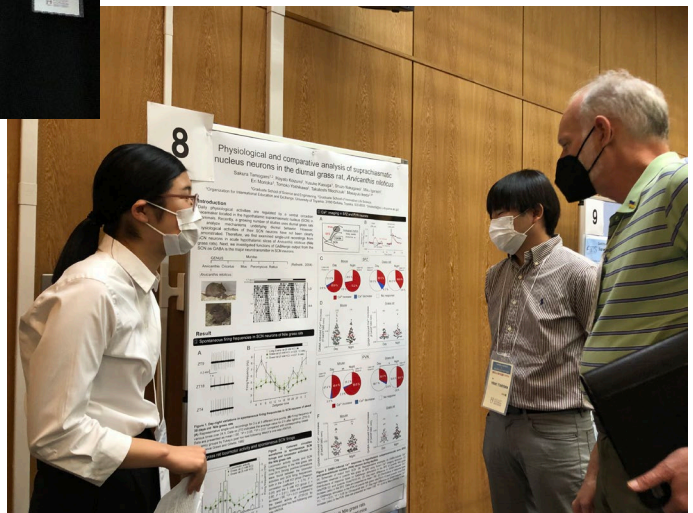
初日シンポジウムの会場の様子。



シンポジウム看板



ポスター発表にて。著者は右端。



ポスター発表にて。著者は左端。

日本時間生物学会会則

制定 2001年1月1日

改正 2021年11月21日

1章 名称

本会は日本時間生物学会（Japanese Society for Chronobiology）と称する。

2章 目的と事業

1. 本会は、生物の周期現象に関する科学研究を推進し、時間生物学の進歩発展を図ること、およびその成果を広め人類の健康と福祉に寄与することを目的とする。
2. 本会は前条の目的を達成するために次の事業を行なう。
 - 1) 学術大会及び総会の開催
 - 2) 会誌等の発行
 - 3) その他本会の目的を達成するために必要とされる事業

3章 組織と運営

（会員）

1. 本会の会員は正会員、名誉会員、賛助会員、臨時会員よりなる。
2. 正会員は、本会の目的に賛同し、所定の手続きを経て、年度会費を納めた者とする。正会員の入会及び退会は別に定める規則による。
3. 名誉会員は本会に功労のあった70歳以上の会員または元会員で、理事会が推薦し総会の承認を得た者とする。
4. 賛助会員は本会の目的に賛同し、本会の事業に財政的援助を行なう者で、理事会の承認を得た者とする。
5. 臨時会員は、正会員の紹介により、学術集会の参加費を納めた者とする。

（評議員）

1. 評議員は推薦基準に従って正会員を評議員として推薦し、これを理事会が決定する。任期は6年で再任を妨げない。
2. 評議員は学会の活動を積極的に行ない、理事を選出する。

（役員）

1. 本会には次の役員を置く。理事長1名、副理事長3名、事務局長1名（副理事長が兼務）、理事若干名、監査委員1名。役員は正会員でなければならない。役員の任期は3年とする。
2. 評議員の選挙で評議員の中から理事10名を選出し、総会において決定する。さらに、理事長は、分野、ジェンダー、あるいは活動地域などを適宜勘案し、8名を超えない人数の理事候補を評議員の中から推薦することができる。推薦された理事候補は、選挙で選出された理事の同意を以て理事に選出される。理事の任期は連続2期までとする。ただし、理事長推薦理事の任期は含めない。
3. 理事は理事会を組織し、本会の事業を行う。
4. 理事長は理事の互選で選ばれ、本会を代表し、会務を司り、総会および理事会を召集する。
5. 理事長を除く理事選挙上位2名と、理事の中から理事長の推薦する1名を副理事長とする。副理事長の中から、理事長が事務局長を選任し、会の総務、財務を担当させる。
6. 理事会は本会の事業を行うために、必要に応じて専門委員会を設置することができる。専門委員会は評議員から構成され、委員長は理事をあてる。これらの委員の任期は理事の改選までとする。
7. 理事会は評議員の中から監査委員を選出する。理事がこれを兼務することはできない。
8. 理事会は学術大会会長を選出し、総会でこれを決定する。学術大会会長は理事でない場合はオブザーバーとして理事会に参加するように努める。

9. 理事長は理事会の承認を得て、学会の運営に対する助言を行う顧問をおくことができる。顧問は65歳以上の正会員とし、任期は理事会の任期終了までとする。

(総会)

1. 本会の事業および組織・運営に関する最終の決定は、総会の議決による。
2. 総会は、正会員より構成される。定期総会は原則として毎年1回開催され、理事長がこれを招集する。
3. 定期総会の議長は、大会会長がこれにあたる。
4. 理事長が必要と認めた場合、あるいは正会員の4分の1以上 または理事の2分の1以上の要請があった場合には、理事長は臨時総会を招集する。
5. 総会の議決は、出席者の過半数の賛成を必要とする。

(学術大会)

1. 学術大会は、原則として毎年1回開催し、その企画・運営は学術大会会長がこれにあたる。

(設立年月日・所在地)

2. 本会の設立年月日は、平成7年(1995年)1月1日とする。
3. 本会の所在地は事務局長を兼任する副理事長の所属施設の住所とする。

4章 会計

1. 本会の年会費は、別に定める細則により納入するものとする。
2. 本会の会計年度は、毎年1月1日に始まり、12月31日に終わる。
3. 本会の会計責任者は事務局長を兼任する副理事長とする。

5章 会則の変更

1. 本会の会則の改正は、理事会の審議を経て、総会における出席者の3分の2以上の同意を経なければならない。

付則

1. 本改正会則は、2016年1月1日から施行する。
2. 本改正にともなう副理事長の選任は、次回(2016年)の理事選挙から開始する。
3. 本改正にともなう理事の連続三選制限は、次々回(2019年)の理事選挙から導入する。ただし、移行措置として次回(2016年)の理事選挙の上位5名は、次々回(2019年)の理事選挙で三選制限の例外とする。

会則施行内規

1. 入会、退会手続き
正会員の入会は、学会ホームページより事務局長まで届け出、理事会の承認を得なければならない。また休会あるいは退会しようとする者も、学会ホームページから事務局長まで届け出なければならない。
2. 会費納入
 - 1) 正会員の年会費は、一般6,000円、学生等3,500円とする。
ただし、会費徴収システムで継続課金(自動支払い)登録をした場合の年会費は、一般5,000円、学生等3,000円とする。
システム利用料(2020年9月現在 消費税込110円)、または振込手数料は会員の負担とする。
 - 2) 名誉会員は会費及び学術大会参加費を免除する。
 - 3) 賛助会員の年会費は、1口20,000円とする。
 - 4) 年会費の改訂は総会の議決を必要とする。

- 5) 会費未納2年以上経過した会員は、会員資格と学会誌の発送を停止し、会費納入の督促を行う。会員資格停止中の会員は、当該年度の年会費に加え、1年分の年会費を納入することで、会員資格を回復できる。
- 6) 長期にわたり年会費を滞納した者は、理事会の承認を得て、除名することができる。
3. 評議員の推薦基準
- 1) 評議員の推薦基準は、原則として本会に所属し3年以上の活発な活動を行い、本会の目的とする研究分野および関連分野での十分な研究歴と業績をもつ（筆頭著者としての原著論文2報以上）ものとする。
- 2) 会員歴が3年未満でも、以下の条件を満たす会員は、理事の推薦と理事会の承認があれば、評議員として推薦できる。
- ・本会の目的とする研究分野と関連する分野で5年以上の研究歴を持っていること。
 - ・本会の目的とする研究分野に関連する学会に3年以上所属し活発な活動を行っていること。
 - ・上記の研究分野および関連分野で筆頭著者としての原著論文が2報以上あること。
 - ・年齢が35歳以上であること。
- 3) 学会の活動を積極的に行うため、大会に直近の3年間に少なくとも1回は学術大会に参加することを再任の基準とする。
4. 理事の選出
- 投票は無記名で5名以内の連記とする。
5. 専門委員会
- 以下の専門委員会をおく。
- ・編集委員会
 - ・国際交流委員会
 - ・評議委員推薦委員会
 - ・広報委員会
 - ・将来計画委員会
 - ・選挙管理委員会
 - ・奨励賞選考委員会
 - ・学術委員会
 - ・その他、理事会が必要と認めたもの。
6. 日本時間生物学会学術奨励賞の選考基準
- 1) 日本時間生物学会会員として、時間生物学領域で顕著な業績をあげ、今後の活躍が期待される若手研究者を表彰する。
- 2) 本章受賞者の年齢制限は、基礎科学部門および臨床・社会部門共通で、応募締め切り時点で、博士学位の取得後11年以内、または、修士学位・6年制課程学士学位（医学部、歯学部、獣医学部、薬学部など）の取得後13年以内であること、かつ、41歳以下とする。
- 3) 上記の目的で理事の中から委員長1名、委員4名より成る選考委員会を設け、公募により募集した候補者の中から本章受賞者を原則として毎年基礎科学部門1、臨床・社会部門1の計2名選定し、賞金を贈呈する。
- 4) 委員会は毎年設置し、委員長及び委員を理事会が理事の中から選出し、選考委員の任期は理事の期間とする。
7. 賛助会員に関する取り決め
- 1) 賛助会員の定義
- ・賛助会員は本会の目的に賛同し、本会の事業に財政的援助を行う者で、理事会の承認を得た者とする。
- 2) 会費
- ・賛助会員の年会費は、一口（20,000円）以上とする。
- 3) 賛助会員の特典
- ・一口につき1名の大会参加費を事務局が負担する。
 - ・日本時間生物学会会誌に賛助会員リストを掲載し、謝意を表す。

・日本時間生物学会会誌、又は日本時間生物学会ホームページに広告記事を掲載できるものとする。
学会誌、又はホームページへの広告記事の掲載は1年間(会費の有効期間)とする。学会誌への掲載ページの場所と大きさは口数に応じて事務局で判断する。

・日本時間生物学会の大会での展示などをする場合は優遇する。

4) 賛助会員の会費の取り扱い

・賛助会員の会費を学術大会の運営費に充当する場合は、6割を超えてはならない。

8. 学術大会の発表に関する取り決め

学術大会の「一般演題」発表の発表者(登壇者)は会員とする。ただし、大会長もしくは理事会が認めた場合はこの限りではない。

9. 時間生物学会優秀ポスター賞の制定

1) 賞の名称および目的: 賞の名称は日本時間生物学会学術大会優秀ポスター賞とし、若手研究者の育成を目的とする。

2) 対象者: 受賞対象者は日本時間生物学会学術大会において優秀なポスター発表をした者とする。

3) 人数: 受賞者の人数はおおむね発表者の5~10%とし、柔軟に対応する。

4) 選考: 選考は選考委員会によって下記のように行う。

・理事会において、理事1名および若手研究者3~4名からなる選考委員会のメンバーを選出する。

選考委員の任期は理事の任期に準ずる。

・選考委員会の委員長は理事が務める。

・審査員は学術大会に参加した評議員が務める。

・審査員は優秀なポスター発表を選び投票する。投票の方法は別に定める。(附則1)

・投票結果に基づき、選考委員会で受賞者を決定する。(附則2)

5) 発表: 学術大会期間中に受賞者を発表して表彰する。

6) 賞品: 賞状に加え、学会参加費及び懇親会参加費に相当する金額の賞金を贈呈する。これに学術大会会長の選定した賞品を追加することは妨げない。

※附則1 審査員は、優秀ポスターを3題選び記名投票する。

※附則2 原則として得票数に基づいて選考するが、受賞歴、基礎科学部門及び臨床・社会部門の発表題数に応じた受賞者数なども考慮する。

10. この内規の改定は理事会の議決を必要とする。

2005年2月2日一部変更 内規 6. 学会事務局設置に関する取り決めに追加

2005年4月23日一部変更 内規 5. 学術委員会を追加

内規 7. 学術奨励賞選考基準を追加

2005年7月8日一部変更 内規 8. 賛助会員に関する取り決めに追加

2006年4月22日一部変更 内規 2. 5) 学会誌発送停止基準を追加

2006年8月4日一部変更 内規 9. 一般演題登壇者の取り決めに追加

2009年11月20日一部変更 内規 10. 優秀ポスター賞制定を追加

2011年4月16日一部変更 内規 7.2) 学術奨励賞年齢制限を変更

2011年4月28日一部変更 内規 10.4) ポスター賞審査員を変更

2011年10月31日一部変更 内規 10.3) ポスター賞人数の内容変更

内規 10.4) ポスター賞選考方法の変更

附則1 内容変更

附則2 内容変更

2012年4月16日一部変更 内規 10.3) ポスター賞人数の文言一部削除

附則2 文言追加

内規 7.1) 学術奨励賞の選考基準に文言を追加

内規 8.3) 賛助会員の特典に文言を追加

2014年11月7日一部変更 会則3章 3. 名誉会員推薦年齢の変更

- 内規 1. 休会事項を追加
- 2015年 6月 17日一部変更 内規 7.2) 学術奨励賞年齢制限を変更
- 2015年 11月 21日一部変更 会則 3章 1. 副理事長の設置、再任の制限
 2. 連続3選の制限
 5. 副理事長・事務局長の選出法の規定
 会則 3章 (設立年月日・所在地) を追加
 会則 4章 3. 会計責任者を追加
 会則付則 1.2.3. を変更。移行措置を規定
- 2017年 10月 27日一部変更 内規 8. 学術大会の発表に関する取り決めに文言を追加
- 2018年 6月 10日一部変更 内規 1. 入会、退会及び休会手続きに文言を追加
- 2020年 9月 27日一部変更 内規 2. 1) 会費変更(正会員 6,000円、学生会員 3,500円)
 継続課金の導入
 5) 会費未納時の取り扱い変更
- 2021年 11月 21日一部変更 会則 3章 (役員) 2. 理事長推薦理事の会則への明文化と、
 人数の増加(5人から8人へ)
 内規 4. 2) 会則へ移行し、削除

助賛会員リスト

以下の団体(代表者、敬称略)から賛助会員として学会運営にご協力いただいております。お名前を掲載し感謝いたします。

三協ラボサービス 株式会社	(椎橋明広)
有限会社 ムルクエスト	(山本敏幸)
ブライライト専門店	(向井嘉一)
一般財団法人 アショフ・ホンマ記念財団	(本間研一)
Crimson Interactive Pvt. Ltd.	(三上しのぶ)
株式会社 電制	(田上 寛)
エダングズ Bld.	(橋口久美子)
株式会社 杏林書院	(佐藤直樹)

日本時間生物学会事務局

執筆要領

2019年12月改訂

原稿について

本誌では、投稿原稿を受け付けています。以下の執筆要領にしたがって原稿を編集局までお送り下さい。原稿の採用については、編集委員会が中心になって査読を行います。必要に応じて関連分野の専門家に依頼し決定します。

原稿は、ワードプロセッサまたはコンピュータソフトを用いて作成してください。原稿のファイルを図表のファイルとともに、編集局へメールの添付書類にてお送りください（送り先：shigey@med.kindai.ac.jp）。メールで送信できない場合には、プリントアウトした原稿1部（図表を含む）とそれらのファイルを保存したCDROMなどを編集局へ送付して下さい（氏名を記載のこと）。ワープロソフトは一般に使われているものなら何でも結構ですが、使用したOSとソフトをお知らせください。図版等は、tif、jpg、pdf形式での投稿を推奨しますが、それ以外につきましては、編集担当者までご相談ください。図や写真をカラーで投稿頂いた場合も、印刷は白黒を基本とします。カラー印刷が必要な場合は、投稿時にお問い合わせ下さい。なお、非会員で総説または技術ノートを執筆いただいた場合、会費免除で1年間本学会会員になることができます。

2011年第1号より、発刊時に日本時間生物学会のホームページ上の学会誌コーナーに原則としてすべての記事をpdfファイルで閲覧することになりました。予めご了承ください。また、別刷は配布いたしません。公開に伴うメールアドレスの公開を見合わせたい方はご連絡ください。総説については医中誌Webに抄録が掲載されます。抄録掲載を許可いただけない場合はご連絡ください。総説は原則として発表済みの内容をもとに記載してください。本誌掲載後、著作権は日本時間生物学会に帰属するものとし、本学会の承諾なしに他誌に掲載することを禁じます。

1. 総説と技術ノート

- 1) 原稿の長さは、図、表、文献を含め刷り上がりで4～5ページ程度（1頁は約2100字と考えて下さい：横1行23文字で1頁46×2=92行）とする。
- 2) 第1頁に表題、著者名、所属及びその所在地、電話番号、FAX番号、E-mailアドレス及び脚注（必要がある場合）を記す。
- 3) 第2頁に400字程度のアブストラクトを記入する。
- 4) 本文に節を設ける場合、1.、2.、3.、・・・とする。
- 5) 参考文献の数は特に制限しないが、50編以内が望ましい。参考文献は、引用順に通し番号を付けて文末にまとめて掲げる。本文中の引用箇所には、通し番号を上付きで示す。

（例）～による¹、…である^{2,4}。

- 6) 文末の参考文献の記載は、次のようにする（*Nature*誌と同形式）。著者が6名以上の場合は、筆頭著者名のみを記載し、以下は「*et al.*」と省略する。

〔雑誌〕 通し番号. 著者名 題名. 誌名, 巻数, ページ (発行年)

〔書籍〕 通し番号. 著者名 題名. 書名 (編者), ページ, 発行所 (発行年)

- （例）
1. Ikegami, K. *et al.* Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Rep.* **9**, 801-809 (2014).
 2. van den Pol, A. in *Suprachiasmatic nucleus* (eds Klein DC, Moore RY, & Reppert SM) Ch. 2, 17-50 (Oxford University Press, 1991).
 3. Yoshikawa, T., Yamazaki, S. & Menaker, M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J. Biol. Rhythms* **20**, 500-512, (2005).
 4. 重吉康史, 長野護 & 筋野眞. 体内時計中枢に内在する同期機構. *生体の科学* **67**, 527-531, (2016).

- 7) 表は原則として3～5程度とするが、必要に応じて増やすことができる。簡潔な標題と必要な説明をつけて、本文とは別の用紙に作成する。
- 8) 図は原則として3～5程度とするが必要に応じて増やすことができる。図には簡単な標題を付ける。図の標題と説明は別紙にまとめる。
- 9) 図及び表は、図1、図2、・・・、表1、表2、・・・の通し番号で表示する。
- 10) 図及び表を文献から引用した場合、引用を明記するとともに、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可をとっておく。

2. 研究室便り

研究室や研究グループの紹介記事。刷り上がりで1～2頁程度。執筆者を含む顔写真、または研究現場のスナップ写真を少なくとも1枚は添付する。写真には標題と説明を付ける。

3. リレーエッセイ

リレー式に次号の著者を指名していくエッセイ。内容は自由。図表や写真も掲載可能。刷り上がりで1～2頁程度。

4. 留学体験記

留学などで滞在した研究室、訪問した研究施設、あるいは海外調査や見聞の紹介記事。写真があれば添付する。刷り上がりで2～4頁程度とする。

5. 関連集会報告

国内外の関連集会の紹介記事。写真があれば添付する。刷り上がりで2～4頁程度。

【倫理】 ヒトを対象とした研究においては、厚生労働省による「臨床研究に関する倫理指針」、厚生労働省・文部科学省による「疫学研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、倫理委員会の審査・許可を経た上で行ったものであることを前提とします。また、動物を対象とする研究においては、所属機関の動物実験委員会等の規定に従い、十分な配慮の上行った研究であることを前提とします。したがって、以上の指針・規定に沿っていない研究については掲載することが出来ませんので、ご注意ください。

【利益相反】 研究データの公正かつ適切な判断のため、研究に関連する可能性のある利益相反（Conflict of Interest: COI）が存在する場合は、本文中に必ず記述してください。所属機関等の第三者がCOIを管理していない場合も、できる限り研究に関与した研究者にCOIが存在することが明らかな場合は記述してください。

編集後記

■特集「視交叉上核発見から 50 年」ご覧いただけたことと思います。企画を提案してくださった中村渉先生に感謝です。「発見から 50 年」ということは、当然その前にそこにつながる研究があったわけですから。長い歴史の上に立って、今日、研究をさせていただいているのだと思うと、身の引き締まる思いです。私自身が SCN の研究に携わり始めてから、幾ばくかの年月が流れています。今回の特集で取り上げられた研究のある時期から以降は、リアルタイムでその発表を目にしてきました。色々と思えばと感慨深いものがあります。

■本間さんと先生の総説の図 4A にあるカスタムメイドの発光イメージング装置。使わせていただいていた。あるとき、装置を別の建物の実験室に移すことになり、解体・再組立てを行いました。ご想像通り、再組立てに結構苦労しましたが、仕組みを理解するいい機会となりました。図 4B の写真。左側手前に写っているのは私です。左奥に立っているのは、おそらく榎木先生（現生理研）。右端でスライサーを使っているのは小野先生（現名古屋大）です。さすがに 10 数年程度では、みなさんの外見はそんなに変わっていないようです。

■千葉先生の訃報に接し、2 つのことを思い出しました。ひとつは、奈良女子大学の石研で使っていた「千葉くん」とラベルの貼られたペン式のイベントレコーダーのこと。千葉先生の研究室で使われなくなったものを「お借りした」と聞いていました。今回の松本先生の追悼文に出てくる「CARPs」の導入が使われなくなった理由だったであろうことが、初めてわかりました。もうひとつは、私が大学院生の頃、パリでの国際学会に参加したときのこと。どういう訳か、千葉先生と一緒させていただく機会が多くありました。なかなかお茶目な方だなあという印象を持ったことを覚えています。

(吉川)

■本稿は SCN 特集だけでなく実に多様な総説が入稿され、一方で残念なお悔やみのお知らせが重なったことにより、過去最高の忙しさを呈しましたが、その分、温故知新な号となりました。

■参加記などの執筆を 8 月の札幌シンポジウムで急遽依頼させていただき、快くお引き受けいただいた先生方、本当にありがとうございました。締め切りまで時間がなく、コロナ禍での開催や現地の様子が良く分かる内容になっているかと思えます。

■外国人の入国制限が大幅に緩和され、円安の影響を論文掲載費用で痛感し、物価上昇のあおりを受けてスーパーで悩むことが多くなった一方、徐々に日常が戻りつつある今日この頃。1 歳半になる娘が食事中ひたすら歩き回りまわり座ってくれない間、運動中の食事は肝臓の時計にどれほど影響を与えるのか気になる今

日この頃でもあります。

■12 月に宇都宮の学会で、例年より分厚い学会誌を手にした皆様とお会いできるのを楽しみにしております。寒さが深まる時期ですので皆様ご自愛ください。

(池上)

■6 年間編集委員会委員長を務めさせていただきました。小説家になることには挫折したのでいつか本をつくる仕事をしたいなと思っておりまして。こんな形で実現するとは思いませんでした。■編集委員には原稿の依頼、催促、査読者の選定、査読の依頼、修正原稿の催促までお願いしてしまいました。また紙面構成や段組みなどの煩瑣な編集作業をお願いしていた吉川先生、池上先生には大変なご苦勞をおかけしました。この方々のご協力、ご尽力がなければ学会誌の発行にいたっていません。おかげさまでなんとか恙無く任を終えることができそうです。

■執筆者には“できるだけ個人的なことの記述をお願いします”とかなり無茶なこともお願いしました。結果、心ふるわせる文章が次々と手元に集まりました。学会誌、全文を HP で公開しておりますので“個人的なこと”を書くためには誹謗中傷や醜聞にならないぎりぎりの線を攻めていただくという名人技が必要です。しかしただただ見事でした。

■時間生物学の分野で多くの業績を残された方々の訃報が届いております。親しい方に追悼文をお願いしました。千葉先生、今回立ち上げた対談企画のリストの最初に名前があがってしまいました。しかしコロナ禍のためにお会いすることができませんでした。草創期のお話を聞き取る機会を失ってしまいました。残念です。堀先生、研究に人生を捧げ多くの研究者を育てた方です。接してこられた方の思いが溢れております。お互いを高め合うつながりに心打たれました。工藤先生、時間生物学への思いを残されて旅立たれたのではないかと拝察いたします。無念ではなかったかと。生きて研究ができることがいかに幸せなことか。

■ほとんどを編集委員に丸投げしてしまいましたので私の功績は無いに等しいのですが最後に対談企画を立ち上げることができました。先日、高橋清久先生にお話をお聴きしました。次号の掲載になります。この企画についてはもう少し携わせていただこうと考えています。“あの頃”の息吹に触れてそれを皆様にお伝えしたい。

■わがままを許していただいた学会員の方々に感謝申し上げます。またどこかでお会いしましょう（お前はどこにいくのだ？）。

(重吉)

時間生物学 Vol. 28, No. 2 (2022) 令和 4 年 11 月 1 日発行

発行：日本時間生物学会 (<http://chronobiology.jp/>)
(事務局) 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1
名古屋大学大学院薬学研究所
神経薬理学分野内 (担当 佐々木)
TEL/FAX : 052-836-3524
Email : chronobiology.jp@gmail.com
(編集局) 〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2
近畿大学医学部解剖学
重吉康史研究室内
TEL : 072-368-1031
Email : shigey@med.kindai.ac.jp
(印刷所) 名古屋大学消費生活協同組合 印刷・情報サービス部