

シアノバクテリアの時計研究の舞台裏

岩崎 秀雄

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

私たちが日常体験しているように、論文に掲載される内容は、研究活動のごくごく一部に過ぎない。私たちは、シアノバクテリアを用いて、概日リズムの基本機構に関する解析を行ってきた。研究の前提や意義などについては、最近いくつか総説や解説を書いたので、参照して頂きたい(岩崎、2002; 2003a, 2003b)。ここでは、その中で私が多少なりとも関与した5つの主要な論文(Ishiura et al., 1998; Iwasaki et al., 1999; Iwasaki et al., 2000; Nishiwaki et al., 2000; Iwasaki et al., 2002)が、どのような経緯で発表されるに至ったか、できるだけ論文に書いていないエピソードを中心に話したいと思う。この作業を通して、私がどのような失敗を積み重ねてきたか、さらに、私の研究の経過に、共同研究者・競争研究者がいかに重要であったかを確認したい。

1. シアノバクテリアの時計遺伝子群 *kai* の同定 (Ishiura, Kutsuna et al., 1998)

この論文は、シアノバクテリアを用いて初めて原核生物の時計遺伝子群 *kaiABC* を同定したものである。私はM1の学生として、この同定作業のごく最終段階に部分的に関与させていただいたのだが、それが私のシアノバクテリアの時計研究の第一歩となった。

私が生物時計の研究に興味を持った、いささか風変わりな理由は最後に述べるとして、近藤孝男・石浦正寛グループに参加したのは幾つかの偶然が絡んでいる。大学3年生の頃、生物時計の総説や本を眺めていた時、『植物細胞工学』という雑誌で生物時計の特集号(1991年)があり、その中に近藤先生(当時、岡崎基生研)の書いたウキクサのリズムの総説もあった。そのほか、後藤健先生(帯広畜産大)、中島秀明先生(岡山大)による総説も大変印象的で、とくに後藤先生の仕事(代謝サイクルやセカンドメッセンジャーを核とするリズム機構の考え方)に大変興味を惹かれた。ざっと御略歴を見たところ、三人の先生とも名大理学部出身と気付いた。当時私が在籍していた名大農学部農学科には、懇意にしていた理学部出身の手塚修文先生(植物生理学)がおら

れた。早速問い合わせしてみたところ、手塚先生も同じ研究室の出身だという。早速手塚先生は近藤先生に連絡をとってくださり、私は、軌道に乗りはじめたシアノバクテリアの研究をそのとき初めて知った。近藤先生らのシアノバクテリアの最初の論文(Kondo et al., 1993, PNAS)が掲載される直前のことであった。近藤先生には、1993年の10月、名古屋での生物物理学会の際にはじめてお会いした。学部4年の時は、昆虫内分泌学で有名な山下興亜教授の研究室に配属し、カイコの細胞周期関連因子の分子生物学的な研究に参加させていただいたが、それは大学院から近藤先生のグループに参加することを前提とした選択だった。

実際に大学院(名大人間情報学研究科)に入った1995年当時、近藤-石浦グループは岡崎の基礎生物学研究所から名古屋大学理学部に転任したばかりだった。引越しが終わる秋口まで、連日岡崎に通って実験をした。当時は、まだグループは小さく、近藤・石浦両先生とともに、京大の博士課程(D3)の青木撰之さん、名大の先輩(D1)の沓名伸介さんが主力メンバーとして研究をしていた。沓名さんと私は、近藤先生による素晴らしい生物発光測定システムとスクリーニング系で得られた長周期変異体(P48と

E-mail: iwasaki@bio.nagoya-u.ac.jp

呼ばれていた)を相補する、ゲノム断片の相補領域の限定と、塩基配列の解析を行った。変異体の相補実験に用いられたゲノムライブラリーは、石浦先生の洗練された実験デザインによるもので、実際の作製には青木さんがあつた。さて、P48の相補領域を含む約5kbの領域を、私たちはP48領域と名付け、そこに含まれる8つのORF(読み取り枠)を仮に遺伝子A~Hと名付けた。1995年の夏休み中、杓さんと私は最終的な遺伝子領域約2kbに絞りこみ、3つの遺伝子からなる時計関連遺伝子クラスターを同定することが出来た。これらはP48領域のD, E, F遺伝子であったことから、それ以降しばらく学会等ではD, E, F遺伝子の名で報告していた。これらの遺伝子はまったく新規の遺伝子で、コードするアミノ酸の配列から機能をまったく推定できなかった。いまだに真核生物に相同遺伝子は見つかっておらず、生化学的機能は未解明である。

さて、これらの遺伝子の特定後、二つのプロジェクトが立ち上がった。一つは転写レベルの解析で、石浦先生の指導の下、杓さんが遺伝子破壊、過剰発現、転写活性の測定など、一連の基礎的な仕事を精力的に行なった。ここから、D, E, F遺伝子(のちの*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*遺伝子)がそれぞれ概日遺伝子発現に不可欠なことで、*kaiB*と*kaiC*がオペロンを構成してリズムミックスに発現すること、*kaiC*を過剰発現すると*kaiBC*プロモーター活性が強く抑制されること、*kaiA*不活化株では*kaiBC*発現が著しく低下することなどが次々と明らかにされた。ここから、KaiC蛋白質による自身の転写抑制(ネガティブ・フィードバック制御)を自励振動の本質とするモデルが考案されることになる。しかし、後述するようにこの解釈には若干問題点もあり、それほどすんなりと出てきたわけではなく、むしろ近藤先生・石浦先生中心に論文作成の段階で練り上げられていったものと記憶している。ともあれ、そのモデルは、初期のショウジョウバエのPer蛋白質による*per*遺伝子発現の抑制、アカバシカビのFrq蛋白質による*frq*遺伝子発現の抑制などと基本的に同様の「単純ネガティブ・フィードバック・モデル」であった。

さて、時計遺伝子同定の初期の結果は95年の名古屋での時間生物学会や、札幌シンポジウムなどで報告されたが、当初は仮の名のDEF遺伝子として発表した。むろん、ネーミングは重要な課題(というより楽しみ)だったから、色々なアイデアが出た。*jikan(jik)*は、個人的にはかなり好きな候補だったが、石浦先生の「俺は濁音は好かん」との一言で却

下。*toki*や*ritsu*はショウジョウバエの変異体の名前として使われていたので、残念ながら使えない。「すべては響である」という仏教の教えから*hibiki*というアイデアも青木さんから出されたが、採用にはいたらなかった。そのほか、*chronos*, *central oscillator (cos)*, *master oscillator (moc)*なども出たが、「折角だから日本語にしよう」という意見で一致した。その中で一旦合意を見たのは*wakka*(輪っか)だった。サイクルの輪にひっかいたこのネーミング、ほのほのとした、なかなか味のある可愛い名前で、例外的に相談した5人の全員一致を見た。ところが、念のため石浦先生が、共著者の一人のCarl H. Jonson(Vanderbilt大)に問い合わせたところ、「wackyというスラング(意味は辞書を見て下さい)を連想させるから頼むから辞めてくれ」とのこと。泣く泣くあきらめざるを得なかった。*kaiten*(回転)も有力な候補だった。この名前は、96年のSRBRでの石浦先生の発表で初めて用いたが、その際も飽くまで仮の名前のつもりだった。ところが、その年にJay C. Dunlapが彼の総説にシアノバクテリアの時計遺伝子の名前を*Kai*と紹介してしまった(Dunlap, 1996)。しかも、もともと*kai*は*kaiten*の短縮形の通称のつもりだったが、いつの間にか*kai*自体がフルネームになった。かくして、DEF遺伝子は、それぞれ*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*となった。*kai*という名称については「実はKondo And Ishiuraの略なのではないか?」という噂が飛び交ったのだが、少なくとも身近にいた私でも、それを肯定する発言を両先生から聞いたことはありません、念のため。なお、Carl Johnsonは「*kai*という名前自体は賛成だが、間違っって欧米人にKay(ケイ: Steve A. Kay)と発音されたらたまらん」という冗談まじり(?)の意見をよこしてきたが、その進言は却下させて頂いた(ただし、海外で講演する際、「ケイと発音しないように」という言葉でしばらくはウケをとることができた。Steve本人にも大ウケだった)。

最終的に*kaiABC*という名称が確定されたのは、論文をまとめる段階だった。1998年に*Science*に掲載されるまでには、相当時間がかかり、そのエピソードも沢山あるのだが、そのいきさつについては省略しよう。ただし、その間、程らによる*mPer1*のクローニング、Takahashiらによる*Clock*のクローニングという哺乳類時計遺伝子の同定とそれに続く急速な展開が、私たちの活動にも大きな意味と影響をもたらしたことを記しておかねばならない。なお、程さんのクローニング情報が、分子生物学会の英文要旨を

通じて海外に伝わったのを受け、Joe TakahashiとMichael Rosbashから近藤先生に直ちに問い合わせが入ったことも思い出深い。

なお、同定作業を行なった岡崎にはSusan Golden (Texas A&M大学) のところから、ポストクのCarol Anderssonが訪れ、3ヶ月ほど共同実験も行なった。英語の訓練にはまたとない機会、最大限利用させて頂いたことが、その後外国人研究者たちと知り合ったり議論したりする上で大変役に立った。なお、名古屋に移ってしばらくしてから、近藤・石浦両先生と杓名さんと私の4人でディスカッションしていた時、話の流れで光周性の分子遺伝学的な解析として、ウキクサを用いた解析をはじめたらどうか、というアイデアが一気に持ち上がったときの熱気も忘れられない。このプロジェクトは、数年後に実際に近藤研で開始され、現在助手の小山時隆さん、院生の三輪久美子さんを中心に活発に展開されつつある。

2. Kai蛋白質の相互作用とタンデム構造 (Iwasaki et al., 1999)

さて、*kai* 遺伝子クローニング後の転写レベルの解析と並んで始まったプロジェクトが蛋白質レベルの解析だった。とは言え、Kai蛋白質はまったく新規の蛋白質で、ATP結合モチーフ以外にこれといった特徴もホモログも見いだせなかった。そこで、とにかく当時流行りの酵母Two-hybrid系を用いて相互作用パートナーを探索しようということになり、私が担当することになった。最初に取り組んだのは、Kai蛋白質間で相互作用があるかどうかの検討だった。遺伝子クラスターを作っていることからして、その可能性があった。さらに、当時は、1994年にPer:PerホモダイマーがRosbashのラボから報告され、1995年にWeitzらがPerの相互作用因子としてTimを同定するなど、時計因子の蛋白質間相互作用に焦点が当てられつつあった時期だった。当時はバクテリアでTwo-hybridを用いた報告はほとんどなく、かなり不安なスタートだったが、Weitzの論文等を参考にして、比較的すみやかにポジティブな結果を得ることが出来た。In vitroの転写翻訳系を用いた相互作用アッセイや、Kai蛋白質の抗体作りなど、ごくごく基本的な生化学的な実験もラボとしては初めてで、今思うとずいぶんまごつきながら実験していたものである。いずれにしても、KaiA, KaiB, KaiCはあらゆる組み合わせで相互作用できるらしかった。しかし、KaiA-KaiB間の相互作用は非常に弱

かった。そこで、KaiCをアッセイ系に添加することでKaiA-KaiB間相互作用が促進された。つまり、どうやらKaiA, KaiB, KaiCは三成分からなる高次複合体を形成できるらしい。折しも、ショウジョウバエの*per^Δ*変異によるPer:Per間、Per:Tim間相互作用異常の報告もなされ、私もそれまでに得られた30種類近くの周期変異の蛋白質間相互作用への影響や、相互作用ドメインを調査することにした。この研究には、途中から院生の谷口靖人さんが加わった。

さて、1996年ころから、次第にバクテリアの全ゲノム配列の解読が報告されるようになった。そこで、当初は配列が出るたびに熱心にKai蛋白質の相同蛋白質の検索をしたのだが、なかなか見つからない。最初に「KaiCに部分的に似てるかも...」と思われたのは、*Methanococcus*という、メタン菌(古細菌)のゲノム中にあったMJ1359という機能不明のORFにコードされる蛋白質だった。しかし、サイズはKaiCの半分しかなく、どうも自信が持てずにいた。そこで、ともかく配列比較を試してみたところ、KaiC蛋白質の前半部分に低い相同性があるようだった。ATP結合ドメインの位置もよく対応している。では、KaiCの後半部分は何かに似ているだろうか？後半部分だけを相同検索したところ、またしてもMJ1359がヒットした。しかも、ATP結合ドメインはまたも対応する位置にある。...ということは、KaiCは前半と後半が似ている重複構造をとっている！この基本的な構造に気付くまで、配列が出てから1年以上かかった。その後、古細菌ゲノムの中に単一ユニットのみの*kaiC*相同遺伝子と、重複構造をとる相同遺伝子が次々と見つかった。また、*kai* 遺伝子の相同遺伝子はシアノバクテリアのゲノム中には一般的に存在するが(持っていないものも最近見つかった)、大腸菌をはじめとする他の多くの真性細菌や真核生物には見つかっていない。こうしたことから、*kaiC*はもともと古細菌で生じたものが重複し、その後シアノバクテリアにとりこまれたのではないかと推測をした。

こうしたことをまとめて論文にしたのだが、いつものように論文の作成は遅れ気味だった。そうこうしているうちに、Carl JohnsonからBRET (bioluminescence resonance energy transfer) という新たな手法を使って、KaiB間相互作用を確認した、との報告を直接聞いた。むろん私たちの結果を受けて行った実験である。しかし彼等は書くのが早い。原稿の内容をめぐって一悶着あったが、調停を重ね、無事に私たちはEMBOJに (Iwasaki et al., 1999)、彼等

のほうはアッセイ法の開発という趣旨で *PNAS* に論文を掲載することができた (Xu *et al.*, 1999)。Kai 蛋白質同士の相互作用の研究はその後も展開し、院生の景山伯春さんの並々ならぬ努力の結果、最近では 500 kDa 以上の巨大な複合体が夜間に形成されることが示されている (Kageyama *et al.*, 2003)

3. SasA の同定と解析 (Iwasaki, Williams *et al.*, 2000)

Kai 蛋白質の結合因子の探索は、1997 年頃から始まった。酵母 two-hybrid 系を用い、私がゲノムライブラリーを作製し、谷口さんがスクリーニングすることになっていた。しかし、私の作ったライブラリーには致命的なコンタミネーションが見つかり、谷口さんの数カ月の努力が水泡に帰してしまう事件が起こってしまった。大いに落胆する谷口さんを見て、私はこれ以上研究を進める自信がなくなり、もう大学院を辞めようと真剣に悩んだが、続けることにしたのは、近藤先生をはじめ周囲の暖かい励ましがあったことだった。谷口さんも、くじけず方針転換し、KaiC の二つの KaiA 相互作用領域を限定し、その変異の効果を論文にまとめることが出来た (Taniguchi *et al.*, 2001)。結局、谷口さんの卒業後に新たなゲノムライブラリーが完成、スクリーニングしたところ、KaiC の相互作用因子候補として、SasA (*Synechococcus* adaptive sensor A) と呼ばれる既知の情報伝達系のヒスチジンキナーゼが釣れてきた。このスクリーニングには、修士の北山陽子さんが尽力してくれた。彼女はその後 Kai 蛋白質の細胞内動態や (Kitayama *et al.*, 2003)、さらに新たな Kai 結合蛋白質の分離、2 波長生物発光同時測定系の開発など、多方面で顕著な成果をあげることになる。

さて、SasA は、奇遇にも名大農学部の水野猛・饗場浩文先生のグループが 1993 年にクローニングした、機能不明のヒスチジンキナーゼだった。面白いことに、シグナルを受容するセンサードメインは KaiB と相同性があり、KaiC との相互作用に十分だった。機能解析のため、饗場さんから *sasA* 領域を含む遺伝子断片を頂き、欠失や過剰発現用のコンストラクトを作った。いよいよ機能解析にとりかかろうとした時 (*sasA* を釣り上げてから 3 ヶ月後)、饗場さんから「Susan Golden のところのポスドク (Stan Williams) から、同じクローンを送ってくれと言って来たから送っておいた」と伝えられ、いざさか焦った。とにかく欠失株を解析したところ、*kaiBC* 遺伝子の発現レベルが劇的に低下し、発現リズムも見

かけ上まったく無周期になっていた。少なくとも時計に大きな影響があることは間違いない。そこで 1998 年の 8 月上旬に Susan に連絡を入れ、無駄な競争をしなくてすむよう協力を持ちかけた。一応、今後の実験予定だけ説明し、できるところは協力しようということになった。私は 1999 年の 2 月までに、欠失実験、過剰発現実験など、基本的な実験を済ませ、「SasA は概日リズムの必須因子であり、KaiC と相互作用するとともに、*kaiBC* の発現の正の調節因子である」という内容でまとめようと考え、早速詳細を Susan に送り、打診した。その返事で初めてわかったのだが、Stan は、実験で SasA に行き着いたのではなく、KaiB の相同遺伝子検索から SasA を見つけていた。彼はもともとバクテリアの二成分情報伝達系の仕事をしていたことがあり、SasA を「KaiB 様配列 + ヒスチジンキナーゼドメインの融合蛋白質」とにらんだのだった。その間、彼等のほうでもいくつか実験をしていたが、彼等のデータでは、*sasA* 欠失株は確かにひどく振幅が低下するものの、リズム成分は確認可能だという。また、こちらでもやりかけていた蛋白質レベルの解析にも着手しつつあるようだった。とりあえず、私は *sasA* 破壊株の表現型の齟齬のチェックに当面専念すること、株をお互いに交換して相互にチェックしてみることに、SasA の蛋白質レベルの解析は Stan に任せること、などを提案した。3 月上旬には私も「低振幅のリズム」を捉えられるようになった。原因は光照度だった。光が比較的強ければ、*sasA* 破壊株のリズムはなくなるが、低照度ならば、かろうじてリズムを確認できた。さらに、その周期は数時間短くなっていた。SasA を「必須の時計因子」とする間違っただけで済んだのは、Susan や Stan と組んで双方でデータをとって確認することができたからだ。つくづく共同研究者は有り難い。私は 3 月下旬にテキサスに飛び、数日間 Stan, Susan と顔を突き合わせてデータを検討し、今後のプランを練った。

最終的に、SasA は基本振動発生の必須要素ではないが、破壊されると振動が不安定化し、周期短縮することから、おそらく基本振動の増幅・安定化に寄与する circadian amplifier である、と推察された。この際、KaiC からの入力と、*kaiBC* 発現を正に調節することを考えると、基本ループに対して二次ループを形成することになる。また、破壊株は明暗サイクル下で (*kai* 遺伝子群とは無関係に) 増殖阻害を示したことから、代謝、光、時計のリンクに位置する因子としても興味深いものであった。課題は多く残

されたが、得られた結果には新規性があり、StanがCell誌を狙ったらどうか、と提案してきた。私は、Genes & Development誌あたりが妥当と考えていたが、ほだされてCellに投稿したのは1999年の年末だった。途中、学位論文の提出などもあったが、いい意味で大変頑固者で妥協の効かないStanと論文を仕上げるには驚くほど根気と忍耐と努力が必要で、結局投稿した頃の前稿は“version 37”にまでなっていた。3人のreviewerの要求は非常に厳しいものだった。そのうちの一つは、掲げられたモデルを「よりファインに」する実験と説明を要求するものであり、科学論文の妥当なチェックというpeer reviewの本質を超えて、査読者・編集者に誘導される形で論文修正をする際の問題点や危険性も感じた。訂正稿で掲げたモデル図は、(どちらかといえば)その場しのぎのアクロバティックな説明を無理矢理ひねりだした点がないにしろあらずで、最終的にアクセプトされたのは嬉しかったが、個人的には忤怩たるころもあった(Iwasaki *et al.*, 2000)。SasAの研究は、その後Stanが新たに立ち上げたユタ大学のラボと私たちのラボで続けられている。

4. KaiCのリン酸化に関する研究：その1 (Nishiwaki, Iwasaki *et al.*, 2000)

KaiC蛋白質の細胞内動態に関して最初に取り組んだのは、ウェスタン解析で量的変動を追うことだった。酵母two-hybrid系の立ち上げの頃から、抗体を作り、解析をはじめていたが、*kaiBC*プロモーターの顕著なリズムに比べ、Kai蛋白質の動きはひどく緩慢で、1年間以上まったくリズムを検出できなかった。一時期、私は「蛋白質レベルの蓄積リズムがほとんど検出できないにも関わらず、転写レベルのリズムははっきりと出る」という“事実”を報告すべきだ、とさえ主張していた。しかし、ある時Carlから「こちらではKaiCの蓄積にもリズムが確認できた」と連絡を受けた。私が実験条件を最適化できていないせいと思え、とても有能なポストドクの西脇妙子さん、院生の富田淳さんに条件を変えていろいろ試していただき、私たちのラボでも蓄積リズムが検出できるようになった。「蓄積リズムなし」との結果を公表せずに済んだのは幸いだったが、冷や汗ものだった。ここでも私は共同研究者に大いに救われた。

当時、1994年のEderyらによるPer蛋白質のリン酸化リズムの発見、1997年のアカパンカビのFrq蛋白質のリン酸化リズムの報告から間もなかったため、Kai蛋白質にもそうした修飾がないものかと考えた

のは自然の成り行きだ。それに、Kai蛋白質の生化学的な機能がまったく推定できなかったため、とにかく何でもいからとっかかりが欲しかったのである。私は主として相互作用と蓄積パターンに集中し、西脇さんがリン酸化の有無を調べることにした。西脇さんは、KaiCがSDS-PAGE上で複数のバンドとして分離でき、移動度の遅いシグナルはリン酸化によること、さらにKaiCのリン酸化に顕著なリズムがあることを見いだした。彼女はさらにKaiCが実際にATP結合蛋白質であることを明らかにし、ATP結合部位の変異体の解析などを行った。当初の標的は、KaiCがATPase活性を持つかどうかだったが、そちらのほうは思うような活性はなかなか得られなかった。

その頃私はSasAの機能解析をしていたが、KaiC共存下でSasAキナーゼの自己リン酸化活性が変化するかを調べたところ、まったく予期しない結果が得られた。1998年の10月末のことである。コントロールとして大腸菌内で合成・精製したKaiC融合蛋白質にATPを加えただけで、リン酸基の強い取込みが見いだされたのである。つまり、KaiCは自己リン酸化能を持つ。これは、ATP結合能とともに、KaiCで見いだされた最初の生化学的な性質であった。さらに、化学安定性実験から、リン酸化残基はセリンまたはスレオニンと推察された。バクテリアでは、真核生物と異なり、ヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸化の報告例が遥かに多く、一般的である。KaiCには既知の真核型のキナーゼドメインは存在せず、シアノバクテリアでは最初のセリン・スレオニン自己リン酸化蛋白質の報告例になった。西脇さんはKaiCのATP結合能に関する論文を準備中であった。KaiCが自己リン酸化能を持つということに関して、私はもっといろいろ調べるつもりもあったが、あまり発表が遅くなるとはいけないし、西脇さんのPNASの論文にこのデータを載せて頂くことにした。ただし、この時には*in vivo*でのリン酸化の話には言及せず、飽くまでATP結合能と、*in vitro*での自己リン酸化に関する論文となった(Nishiwaki *et al.*, 2000)。

5. KaiCリン酸化の話：その2 (Iwasaki, Nishiwaki *et al.*, 2002)

偶然*in vitro*のKaiCの自己リン酸化活性に気付いてから、SasAの解析を続けつつ、KaiAやKaiBによる自己リン酸化活性への影響を調べてみた。私の当時のアッセイではKaiBの効果はまったく見られな

ったが、KaiAの添加により、KaiCの自己リン酸化が著しく上昇することがわかった。明らかにKaiAのKaiCに直接なんらかの作用を及ぼしている。

SasAの解析にある程度目処が経つのと同時に思いついた別の課題は、Ishiura *et al.* (1998)のモデルの妥当性を検討することだった。前述の通り、当時のモデルには問題点があった。KaiCは単純に自己抑制因子とされていたが、*kaiC*欠失株では決して*kaiBC*プロモーター活性は上昇しない。むしろ平均以下のレベルであった。いっぽう、アカパンカビの自己抑制因子Frqの場合、*frq*遺伝子破壊は*frq*遺伝子プロモーターの劇的な上昇をきたす。KaiCが抑制因子と考えられたのは、欠失実験ではなく、副作用の起こりかねない過剰発現実験で*kaiBC*プロモーターが強く抑制されたためだった。この点は、注意よく読めば*Science*の論文にも言及してあるが、どちらかといえばマイナーな問題点とされていた。私はそれがいささか気になった。また、Kai蛋白質同士の相互作用やKaiCのATP結合能・自己リン酸化能という蛋白質レベルの観察と、転写リズムの自己制御をどのように絡めるのかも見通しが立っていなかった。ともかく、*kai*遺伝子同士の遺伝学的な関係をもう少し検討してみようと思った。そこで、*kaiA*、*kaiB*、*kaiC*それぞれの機能欠失株で*kaiA*または*kaiC*遺伝子を過剰発現させ、*kaiBC*プロモーター活性をモニターした。野生株で*kaiC*過剰発現を行うと、*kaiBC*プロモーターは強く抑制され、リズムが停止される。*kaiA*不活化株でこの実験を行うと、*kaiBC*プロモーターはむしろ緩慢に上昇する結果が得られた（ただし、*kaiA*不活化株自体の*kaiBC*プロモーター活性はもとから低く抑えられている）。逆に、*kaiA*を野生株で過剰発現すると*kaiBC*プロモーターの活性は上昇し、無周期化するが、この実験を*kaiC*欠失株で行うと、*kaiBC*プロモーター活性はまったく変化しなかった。以上の結果から、KaiAとKaiCは協調的にポジティブにもネガティブにも働くと示唆された。むしろ、これはかなりトリッキーな実験である。過剰発現実験は、本来ありえないレベルに特定の蛋白質が増えたことに依存する、異常な攪乱を起こしかねない。したがって、この種の実験はごく限られた範囲内で解釈の参考にする程度が望ましい。しかも、この実験を変異株で行うのだから、二重に注意が必要だ。いずれにせよ、*kaiA-kaiC*間相互作用を裏付けるデータは遺伝学的スクリーニングからも得られた。以前、*kaiA*と遺伝学的に相互作用しうる因子を特定するため、*kaiA*上の長周期変異株*kaiA2*の変異を抑

圧する変異株（サブレッサー）をスクリーニングしたことがある。周期が野生型に戻ったその変異は、*kaiC*遺伝子上に見つかった（*kaiC15*）。

次に、細胞内でのKaiCリン酸化状態を、様々な時計変異株で検討したところ、*kaiA*不活化株ではリン酸化型KaiCの蓄積が見られない。逆に、*kaiB*不活化株ではリン酸化KaiCの過剰蓄積が認められた。したがって、*in vivo*でもKaiAはKaiCリン酸化に重要と考えられた。また、面白いことに*kaiA2*変異株ではKaiCのリン酸化レベルが低下するが、*kaiA2kaiC15*二重変異体（周期サブレッサー変異株）ではリン酸化レベルが回復されていた。

私達は、以上の結果を論文にまとめることにした。その際、西脇さんによるKaiCのリン酸化リズムの報告も前提として入れさせて頂いたので、この論文では西脇さんはco-first authorになってくれた。しかし、KaiCのリン酸化に関する論文は、シアノバクテリアにしては厳しい競争の中で作成された。KaiCの自己リン酸化に対するKaiAの効果は、事前にS. GoldenやC. Johnsonに伝えてあった。KaiBについては、GoldenのところのStan WilliamsがKaiAの効果（KaiCリン酸化促進効果）に対して抑制的に働くとの結果を出した。そこで、StanらはKaiBの効果も含め、*in vitro*のリン酸化の性質と、KaiAの部分NMR解析情報とカップリングさせた論文を準備した。本来、その内容は私たちが論文の作成について事前協議したスケジュールや内容とは異なっていたが、彼等はそれを先に*Science*に投稿した（私達の論文作成の遅れも重大な一因）。それを聞いて私達も、同時掲載の可能性を求めて（KaiBの解析結果も加えて）*Science*に投稿したが、残念ながら両者とも却下された。そこで、私達はKaiBの解析部分を外して*PNAS*に投稿し直し、彼等もそれに続き、無事両者とも同じ号に掲載された（Iwasaki *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002）。この間KaiBの解析を主に行っていた北山さんには、内外の調整に巻き込む形で随分迷惑をかけてしまった。彼女の素晴らしい粘りと周囲のサポートもあり、*in vivo*、*in vitro*の解析に加え、Kai蛋白質複合体形成や局在性に関する検討を踏まえたKaiB中心の論文が*EMBO J.*に掲載できたのは本当によかった（Kitayama *et al.*, 2003）。

この間、Johnsonラボもリン酸化に関する研究を遅れて開始し、論文を整備できる段階になっていた。リン酸化に関する限り、内容はすでに私達やStanの結果と同様だったが、彼等はそれにKaiC蛋白質の安定性や、ゲノムワイドな転写調節の話を含めて、よ

り大きな論文にまとめあげた。後者は、KaiCの特定のcisエレメントは必ずしも振動発生に必須ではない、という重要な内容を含んでいた。それについては、私達のラボでも彼らと情報交換しつつ、ポストドクの中平洋一さんを中心に研究が進行していた。結果的には協議や言い合いをしつつ、彼等の論文は2003年のEMBOJに (Xu *et al.*, 2003)、私達の論文は別の観点からの実験結果も加えて2004年にPNASに掲載された (Nakahira *et al.*, 2004)。この経緯の詳細は省くが、一悶着も二悶着もあった。さまざまな思惑が複雑に絡み合い、大量のシビアなメールのやりとりをしながら調整にあたり、少なからず消耗・辟易し、まだなかなか整理のつかない問題点について、いろいろ考えさせられた。そのいっぽう、Johnsonグループの優秀なポストドク、Tetsuya Mori (盛徹也さん) とは、とても有益な情報交換を行うことができ、感謝している。

その後の私達のグループの研究の流れや概要については、最近書いた総説 (岩崎, 2003a) を参照して頂きたい。現在では、現行の真核生物での転写翻訳フィードバックモデルから、さらに大きく逸脱した概日発振機構の可能性が検討されつつある。それについては、近い将来機会を改めて報告させて頂きたい。シアノバクテリアのリズム研究は、KaiCの生化学的機能や周期決定機構、ゲノムワイドな転写調節の機構など、まだまだ課題が多く、未解明の重大な謎がたくさん残されている。その解明は、多くの意外な事実の発見と、興奮と感動に満ちたものになるはずだ。

終わりに...

まず、私が行ってきた研究には、以上述べたように、多くの共同研究者の協力が当然ながら不可欠だった。また、研究や論文作成の大半が、内外の共同研究グループ・半競争グループの進捗状況に依存しつつ、研究室内部の事情も絡む形で発表にこぎつけたものであった。その間、私自身は共同研究者たちに迷惑をかける側面もずいぶん多く、反省すべきことが多かった。上に書いたこと以外にも、原稿のチェックや追試の遅れ、並行して行うべきラボの事務・管理や実験指導の怠慢、海外の共同研究者の立場とラボの研究メンバーの立場の違いをうまく調整仕切れなかったこと、研究テーマの割り振りで一部不満を招いてしまったことなど、山のように不手際があった (今でも多分ある)。その中でも、これほど充実した研究を共有する機会を与えてくれた彼女

ら、彼ら (ここにはお名前をあげることの出来なかった多くのラボメンバー・共同研究者・関係者も含めて) に、心からお礼とお詫びを申し上げたい。世界的にも珍しくシアノバクテリア研究者人口が高く、日本有数の生物リズム研究密度を誇る名古屋大学の研究環境にも感謝である。

大学院在籍中から心掛けたことは、内外の研究者とできるだけフランクに議論し、幅広く情報交換することと、若手の研究者・院生と連絡をとりあうことだった。今でも、吉村崇さん (名大)、松本顕さん (九大)、上田泰己さん (理研)、八木田和弘さん (神大・名大) などには特に日頃から議論や相談にのって頂いている。こうした若手の交流には、近藤先生をはじめシニアの大御所の方々、有能な中堅の研究者の方々の暖かいご理解が不可欠だった。たとえば、研究室を気楽に訪問させて頂いたり、若手交流会 (犬山, 1999年)、学会での若手シンポジウム (山口, 2001年) の後援など、大変好意的に支援して頂いたりしたことは、私達若手にとって大きな励みで、大変ありがたかった。

さて、ここに書いたことは私の立場から見た、限定された記憶とメモによる、意図のあるなしに関わらず限定されたスケッチに過ぎない。しかし、自然科学の研究は、主観と思惑と日常のせめぎあいの中で、そのときどきの条件に依存しながら冷静かつ熱っぽく進行する。たとえ導き出されたデータや解釈が単純明快であっても、そこには常にさまざまな事情が複雑に入り組んだ背景がある。自然科学が社会的に無視し得ない重みを決定的に増し続けている現在、そうした背景からどのように科学的成果がもたらされ、社会的に伝達・受容され、淘汰されていくのかを冷静に把握することは、現代の人間や社会の営みのダイナミクスを考える上で極めて重要である。私はそこに、科学と市民社会、文化や思想をつなぐ (あるいは既に繋がれている) 様相やヒントを垣間みることも期待している。

時間生物学は極めて多義性/多様性に富み、ダイナミックな領域 (ディシプリン) として展開してきた。私たちは生命のリズムをどのように面白がり、大切に思い、情熱を傾けてきたのか。さらに、この分野が扱う内容が、自然科学以外の周辺領域とどのように関わり、影響を与えあってきたのか。実は、私の時間生物学の研究に参入したのは、もとはといえば、このような「時間・生物・生命・リズムをめぐって交わされてきた考え方や周辺領域を、科学史・文化史の問題系として捉え直すこと」への科学

論 (Science Studies) 的な興味に基づいている。その興味は、大学2・3年生のときに「生物時計」という概念を初めてまともに聞いた時にはじまり、ますます強くなるばかりである。時間やリズム、時計といった内容を扱うゆえに、時間生物学には周辺領域との独特の接点があり、その隣接領域は狭義の自然科学の範疇を遥かに超えている。真の意味で文理の枠を超えた融合型研究に適した境界条件を、この分野が必然的に備えていることは間違いない (この点、山口大学の時間学研究所が、時間生物学を柱の一つとして取り込む形で新たに設立されたことは素晴らしい)。こうした条件を注視し、理解を深めながら、今後の研究を模索・展開していきたいと思っている。そこでは、高度の科学研究の理解を前提として、自然科学に限らぬ他分野との対話・リベラルアーツの積極的な理解がより重要になってくるだろう。関連して、生命誌研究館に依頼されて昨年書いた小文がweb上で公開されている (岩崎, 2003b; 2003c)。ご意見・ご批判を頂ければ幸いです。

参考文献

- Dunlap, J.D. (1996) Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 30: 579-601
- Iwasaki, H., Taniguchi, Y., Ishiura, M., Kondo, T. (1999) Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *EMBO J.* 18: 1137-1145
- Iwasaki, H., Williams, S., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S.S., Kondo, T. (2000) A KaiC-interacting histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillations in cyanobacteria. *Cell*, 101: 223-233
- Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., Kondo, T. (2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 15788-15793
- 岩崎秀雄 (2002) 「シアノバクテリアの概日リズムの発振機構について」 *日本時間生物学会誌* 8 (1) : 5-10
- 岩崎秀雄 (2003a) 「シアノバクテリアの概日リズム制御研究の新展開」 *細胞工学* 22 (12) : 1309-1314
- 岩崎秀雄 (2003b) 「時を刻むバクテリア」 (3節「生命と時計」をめぐる歴史) : *生命誌ジャーナル*, web版 http://www.brh.co.jp/experience/exhibition/journal/37/research_21.html
- 岩崎秀雄 (2003c) 「生物時計と歴史」, *生命誌研究館HP*, コラムの庭 <http://www.brh.co.jp/salon/column/msg.php?89>
- Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.H., Kondo, T. (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 281: 1519-1523.
- Kageyama, H., Kondo, T., Iwasaki, H. (2003) Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.*, 278: 2388-2395
- Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2004) Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 881-885.
- Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., Kondo, T. (2000) Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 495-499
- Taniguchi, Y., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Iwasaki, H., Kamagata, K., Ishiura, M., Go, M., Kondo, T. (2001) Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *FEBS Lett.*, 496: 86-90
- Williams, S.B., Vekonakis, I., Golden, S.S., LiWang, A.C. (2002) Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15357-15362.
- Xu, Y., Piston, D.W., Johnson, C.H. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock

proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 151-156.

Xu, Y., Mori, T., Johnson, C.H. (2000) Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *EMBO J.* 19: 3349-3357.

Xu, Y., Mori, T., Johnson, C.H. (2003) Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* 22: 2117-2126.