

シンポジウム報告

"Symposium on Molecular Basis for the Biological Clock"

(1998年12月4日,名古屋市,ルブラ王山)

岩崎秀雄¹⁾

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
生物リズム研究グループ

概日時計機構を解明する上で、分子遺伝学は極めて有力な解析手段である。生物時計の分子遺伝学的解析は、従来ショウジョウバエ、アカパンカビで進められてきた。しかし、ここ数年で、藍色細菌(シアノバクテリア)、シロイヌナズナ、さらにマウスでも精力的に解析されるようになり、いまや分子生物学研究の中でも最も華々しい領域を占めるまでになってきた。昨年(1998年)は、こうしたモデル生物でそれぞれに多くの重要な成果が公表され、概日時計の研究史の中でも特筆すべき年となった。そして、昨年末(12月4日)に名古屋で開催された日米の最前線の生物時計研究者たちによる公開シンポジウム「**Symposium on Molecular Basis for the Biological Clock**」は、その活況を概観する絶好の機会となった。

このシンポジウムは日米生物時計会議(鈴鹿市;吉村崇氏の報告を参照)の機会を利用して、昨今とみに盛んな生物時計の分子レベルの解析の最先端を、生命科学に興味のある方々に広く紹介する目的で企画された(オーガナイザー:名古屋大学・近藤孝男,同・海老原史樹文, Virginia 大学・Gene Block の各氏)。シンポジストの方々は次の通りである(講演順)。

中島秀明氏(岡山大学), Carla Green 氏(Virginia 大学), Michael Young 氏(Rockefeller 大学), 岡村均氏(神戸大学), 本間さと氏(北海道大学), Carl Johnson 氏(Vanderbilt 大学), 石浦正寛氏(名古屋大学), Steve Kay 氏(Scripps 研究所), Michael Menaker 氏(Virginia 大学)



シンポジウム会場
の様子

¹⁾ Email: iwasaki@bio.nagoya-u.ac.jp

参加者は全国各地から80人を数えた。講演は英語で行われたが、講演要旨集に全て和訳が付けられたこと(一部大きな誤訳もありましたが...)や、各講演の前に座長(深田吉孝, 柴田重信, C. Johnsonの各氏)が丁寧に講演者・講演内容の紹介をしてくれたことは特に好評だった。時間的な都合でシンポジウム終了後に懇親会を設けることが出来ず、それが残念だという声も聞かれたが、活発な質疑応答を得て盛会に終わることが出来た。

以下、各講演を感想を交えて簡単に紹介する。とは言え紙面(+報告者の実力不足)の都合上、十分に個々のデータの面白味を伝えることは出来ない。そこで、各講演に関連する文献がある場合は、私が把握している限りで参考までに記しておくことにした(ただし原則として1998-99年に各シンポジストのグループから出されたものに限定させていただいた)。

<ショウジョウバエと哺乳類の生物時計機構:
Michael Young氏, 岡村均氏, 本間さと氏>

1997-98年の生物時計研究の最も重要な成果の一つは、ショウジョウバエ *Drosophila* と哺乳類の概日時計が同じタイプの部品(時計遺伝子群)を共有していることが報告されたことだろう。一昨年までに、ショウジョウバエでは分子遺伝学的解析から次のような時計の分子モデルが提案されていた。それは、時計蛋白質(生物時計の発現の構成因子)の *Period* (*Per*) と *Timeless* (*Tim*) が直接もしくは間接的に自らをコードする遺伝子の発現を抑制し、*Per* と *Tim* の蛋白質量が約24時間周期で自励振動するという時計分子振動モデル(時計蛋白質のネガティブ・フィードバック・ループ・モデル)である。故 Colin Pittendrigh 氏はこれを「TTO (transcription/translation oscillator)モデル」と呼んだ。ショウジョウバエでは、時計遺伝子の mRNA 量のリズムとコード蛋白質量のリズムの間には数時間のタイムラグ(位相のずれ)が見られる。これは時計分子の概日振動の安定化に寄与するとされ、*Per* と *Tim* が細胞質で複合体を形成して核移行する過程はその重要な律速段階であると考えられている。

per, *tim* 両遺伝子のクローニングをはじめ、ショウジョウバエの生物時計の分子機構の解析をリードしてきた Michael Young 氏は、新たに同定した時計遺伝子の解析を中心に、ショウジョウバエの生物時計の分子遺伝学的解析の現状を紹介した。Young 氏らは *per*, *tim* 以外の時計遺伝子を探すべくショウジョウバエの複数の行動リズムの突然変異体を分離し、第三の時計遺伝子としての原因遺伝子 *doubletime* (*dbt*) を同定した(1, 2)。Dbt 蛋白質は哺乳類のカゼインキナーゼ I と高い相同性を持ち、その変異により、行動リズムや *per/tim* 遺伝子の発現リズムが短周期型、長周期型あるいは無周期型に変化した。これらの周期変異体では *Per* 蛋白質の安定性が変化した。とくに *dbt* 遺伝子の欠失変異体(無周期; 蛹で致死になる)では、リン酸化されていない *Per* 蛋白質が常時過度に蓄積していた。また、*in vitro* のアッセイ系では *Per* と *Dbt* は相互作用することが示された。これらの結果から、*Dbt* が細胞質で *Per* をリン酸化し、*Per* の安定性(ないし蓄積量)を制御するというモデルが提案された。最後に Young 氏は、Joseph Takahashi 氏 (Northwestern 大学) のグループとの共同研究による哺乳類の *tim* 相同遺伝子 (*mTim*) の発見とその解析(3)についても手短かに報告した。*mTim* は視交叉上核(SCN)で発現しているが、ショウジョウバエと異なり発現量には概日変動は認められなかった。しかし、生化学的な解析およびショウジョウバエの培養細胞の系を使った解析から、哺乳類においても *mTim* 蛋白質が *mPer* 蛋白質のパートナーとして機能している可能性を指摘した。

岡村均氏は、哺乳類の時計遺伝子候補である3つの *per* 相同遺伝子 (*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*) と *mTim* 遺伝子について包括的な発現解析・生化学的解析を報告した(4-6)。*mPer* ファミリーは SCN で安定した概日発現を示すが、それぞれのリズムのピークの位相はお互いに異なっていた。また、脳内での分布もそれぞれに異なっていた。興味深いことに *mPer1* と *mPer2* には光誘導性があり、時計の光位相応答に密接に関与しているようである。いっぽう *mPer3* は光によって誘導されない。これはショウジョウバエの *per* 遺伝子と同じ性質である(注: ショウ

ウジョウバエは光により Tim 蛋白質がすみやかに分解されることが位相応答を引き起こすと提案されている)。mTim についても脳内の発現パターンについての報告があり、また哺乳類の培養細胞を用いて生化学的に mPer-mTim 蛋白質間の相互作用を検出していた。岡村氏のグループの手になる詳細な脳の *in situ* ハイブリダイゼーションのデータはいつもながら美しく、私には大変印象的であった。また、昼行性の動物としてサルを用いた *Per* の発現パターンの解析や、線虫 *C. elegans* の *tim* 相同遺伝子の発見についても報告があり、種を超えた共通の時計遺伝子(候補)の解析が今後ますます急速に進展していくことを予想させた。

昨年、哺乳類およびショウジョウバエで *Clock* と *Bmal1* という二つの蛋白質が *per* 遺伝子の転写を直接活性化するらしいことが報告された。もともと *Clock* 遺伝子はマウスの行動リズム変異体の原因遺伝子としてクローニングされ、*Per* にも存在する PAS ドメインを持つ転写因子をコードしている。いっぽう *Bmal1* 遺伝子も PAS ドメインを持つ転写因子として池田正明氏(埼玉医科大学)らによって特定された。今回のシンポジストの一人 Steve Kay 氏(後述)はショウジョウバエで巧妙な実験を行い、*Clock*-*Bmal1* 複合体が(おそらく直接)*per*、*tim* の転写を活性化し、しかもその活性は *Per*-*Tim* 複合体によって抑制されることを見出した(7)。哺乳類でも *Clock*-*Bmal1* 複合体が *mPer* の発現を活性化することがわかってきている。今回、本間さんと氏はこの二つの転写因子の生理機能を明らかにするため、ラットを用いて(生物時計が局在する)視交叉上核および網膜での *Bmal1* と *Clock* の mRNA レベルの経時変動と光反応性を検討した(8-10)。SCN では、*Bmal1* mRNA は主観的暗期に上昇する概日リズムを示した。いっぽう *Clock* 遺伝子も概日発現し、主観的明期にピークを持つとの報告があった。網膜では *Clock* の発現は低振幅のリズムを示すが、*Bmal1* mRNA はリズムを示さなかった。さらに、連続暗条件下での 30 分の光照射により、SCN・網膜ともに *Clock* mRNA レベルは位相依存的に上昇し、*Bmal1* mRNA は位相に関係なく上昇した。このことから本間氏は、*Clock*、*Bmal1* がそれぞれパラメ

トリック、ノンパラメトリックな光応答に関与している可能性を考察した。私には、*mPer* に比べれば、*Bmal1* と *Clock* のリズムの振幅や光誘導の程度は小さいように思われたが、確かに生理的に重要な意味があるかも知れない。今回明らかにされた *Bmal1* と *Clock* の発現パターンと、発振機構・光応答機構との具体的な関わりについてのよりファインな機能解析が待たれる。また、他のグループからの報告も加味すると、*Clock*、*Bmal1* 相同遺伝子の発現パターンは、ショウジョウバエ、マウス、ゼブラフィッシュなどの中で互いに異なる点もあるようだ。こうした相同遺伝子がそれぞれの生物でどのように時計機構に関与しているのかという点も興味深い。

さらに、本間氏は電気生理学的な手法を導入し、培養した SCN の細胞での個々の神経活動(発火リズム)を測定し(11)、2 神経細胞間のシナプス結合の有無と振動カップリングの有無の対応付けに成功した。この報告は、細胞内振動発生機構のみならず振動体間カップリングに関する分子レベルの解析も今後の重要な課題であることを提示している点で大変興味深いものであった。こうした電気生理学的手法と分子生物学的手法を組み合わせることで、時計研究の新たな展開が見られるようになるのもそう遠いことではなさそうである。

<光入力系と時計の接点: Steve Kay 氏>

高等植物の生物時計の分子遺伝学研究的の草分けとして名高い Steve Kay 氏は、先述のように数年前からショウジョウバエを用いた研究でも顕著な成果をあげている。今回のシンポジウムでは、Kay 氏は主として植物での生物時計の光制御との関わりについて報告し、加えてショウジョウバエにおける光入力系因子の同定にも触れた。高等植物の分子遺伝学モデル生物であるシロイヌナズナ *Arabidopsis* は、特定の遺伝子ターゲティングが出来ないといった技術上の問題点がある。しかしながら、シロイヌナズナはその(時計に限らない)光情報伝達系に関する豊富な生理学的・遺伝学的な蓄積があり、時計と光入力系の接点一般を研究する上で最も有力なモデル系となっている。Kay 氏のグループは、高等植物の光受容体蛋白質として知ら

れるフィトクローム(PhyA, PhyB)やクリプトクローム(Cry1, Cry2)の突然変異株を用い、さまざまな光条件下で光合成系の遺伝子の概日発現リズムがどのように影響されるのか詳細に調べた(12)。それによれば、PhyBは強い赤色光による時計の光応答を主として仲介し、PhyAは弱い赤色光による制御を担っているらしい。また、Cry1はPhyAと共同して弱い青色光による時計の制御を仲介し、強い青色光による制御はCry1が(PhyAに関係なく)担っているようであった。ところで、Molecular circadian biologyの次なる射程の一つは、概日時計を基盤とする光周性(photoperiodism)の分子機構の解明であろう。長日性花芽誘導を行うシロイヌナズナは、この一般生物学の重要課題に取り組む上でも、今のところ最も優れたモデル生物である(アカパンカビ、キイロシヨウジョウバエ、藍色細菌などでは光周性反応が報告されていないか、あるいは再現よく観察できない)。Kay氏は、シロイヌナズナの花成制御に関わる変異体で概日リズムを観察すること、あるいは逆にKay氏らが分離している概日時計変異体(*toc*変異群)の光周的花芽誘導を調べることで(13)、この問題に取り組んでいることも紹介した。最後にKay氏は、Jeff Hall氏(Brandeis大学)らとの共同研究による、シヨウジョウバエのクリプトクローム変異体(*cry baby*)の分離と解析(14)を報告した。この変異体(おそらくnull mutant)では、大部分の組織での*per*, *tim*遺伝子の発現リズムの光応答が抑制され、行動リズムは消失しない(行動リズムの光同調能は著しく低下する)。クリプトクローム変異体では、殆どの組織で*per*, *tim*遺伝子の発現リズムが消失するが、驚くべきことに、行動リズム中枢(lateral neuron)での*per*, *tim*の発現リズムだけは維持されていることがわかった。詳細な解析から、lateral neuronではクリプトクロームと他の光情報伝達系がredundantな時計への光入力系を構成していることが明らかにされた。なお、最近哺乳類でもクリプトクロームが二つのグループから概日時計の位相応答、さらに振動維持自体にも重要であると報告され、今後の展開が期待される。

<アカパンカビを用いた時計機構の解析: 中島秀明氏>

アカパンカビ *Neurospora* は、シヨウジョウバエと並んで生物時計の分子遺伝学的研究をリードしてきた代表的なモデル生物である。現在までに*frequency (frq)* 遺伝子が時計の主要因子として特定され、Frqを中心とするネガティブ・フィードバック・モデルが提案されている。最近では光情報伝達系遺伝子の*wc-1*, *wc-2*がともに*frq*遺伝子の転写を活性化し、時計機構に関与することがわかってきた。アカパンカビを用いて概日時計の遺伝学的解析を展開している中島秀明氏は、こうしたアカパンカビの研究の現状を紹介し、さらに中島氏の研究室で遺伝子挿入法によって分離された興味深い3つの時計変異体(*rhy-1*, *rhy-2*, *rhy-3*)の解析を報告した。このうち*rhy-2*は*wc-1*遺伝子の転写活性化領域の直後への挿入変異株であり、挿入部位に存在する構成的発現プロモーターからの転写により、部分的なWC-1蛋白質(PASドメインを含む)が生成するらしい。中島氏は*wc-1*のnull mutantあるいは野生株にさまざまな*wc-1*由来の遺伝子断片を導入してリズム解析を行い、光情報伝達系と生物時計の双方に重要な*wc-1*の位置付けを議論した。*rhy-3*変異株は、FRQ-Sのみが存在する条件で無周期になる変異株であった(*frq*遺伝子はFRQ-L, FRQ-Sという二つの翻訳産物を合成する)。この変異株の発見は、いまだに具体的な作用機構のはっきりしない二種類のFRQ蛋白質のそれぞれの機能を考える上で大変興味深い。*rhy-1*と名付けられた変異株は、29°Cを超えると無周期になる。さらに興味深いことに、この変異株のPRCを作製したところ、生物時計の光感受性が大きく影響されていた。このことから、*rhy-1*遺伝子が時計の位相合わせに関係する遺伝子である可能性が示唆された。

これらの変異株の解析は、今のところ無性胞子形成リズムを指標としており、今後*frq*遺伝子の発現、FRQ蛋白質の経時変動といった分子レベルの解析を行うことで、我々の理解をさらに深めてくれるだろう。中島氏は代謝と生物時計の相互作用に着目した地道な遺伝学および薬理学的解析も行っており、Jay Dunlap氏(Dartmouth大学)らの仕事とは一線を画す、ユニークな生物時計の研究を進めておられる(その成果の一部は鈴鹿市での会議で報告

された)(15)。こうした作業は、現在盛んな(成長には直接関与しない概日時計特異的な)時計遺伝子の解析の「その次に来る展開」を見越したもので、大変重要な仕事になると感じられた。

<藍色細菌を用いた時計機構の解析: 石浦正寛氏, Carl Johnson 氏>

従来のアカパンカビ, ショウジョウバエ主導型の生物時計の分子遺伝学的解析の流れの中で、極めてエレガントなモデル系として数年前に登場したのが、藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 を用いた実験系である。この系では、時計に制御される遺伝子のプロモーター(発現制御流域)の下流に生物発光レポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子を連結したものが藍色細菌に組み込まれている。このことにより、遺伝子の概日発現は明瞭な発光リズムに変換され、それを高性能で自動計測するシステムが構築されている。石浦正寛氏は近藤孝男氏とともにこの系を立ち上げ、昨年原核生物初の時計遺伝子群 *kaiABC* の同定と解析を公にした(16)。今回のシンポジウムで、石浦氏はこの強力なモデル系の開発の過程を説明し、それによっていかに多くのメリットを得られるか印象深く語った。たとえば、藍色細菌では遺伝子操作が極めて容易であり、しかも発光リズムの自動測定により再現性よく高精度で時計の生理解析が可能となっている。また、寒天培地上の約1万を越すコロニーそれぞれから同時に個々のリズムを自動測定することが可能で、従来のモデル系に比べ、けた外れにスクリーニング効率がよい。こうした利点を援用して、石浦氏は100クローンにおよぶさまざまな概日時計変異体を分離し、遺伝子相補法によって3つの原因遺伝子 *kaiABC* を同定した。*kaiABC* は新規蛋白質をコードしており、今までに得られた時計蛋白質との相同性はまったくくない。*kai* 遺伝子群は概日発現し、遺伝子破壊や過剰発現を駆使した詳細な解析から、KaiCを中心とする自己フィードバック制御(KaiCによる自身の遺伝子発現抑制)が時計機構の中核に位置する可能性が示唆された。つまり、バクテリアの概日振動の発生にも、形式的にはショウジョウバエやアカパンカビで提案されるモデルが適用できるらしい。しか

し、*kai* の概日発現自体が本当に時計機構に必須なのかどうかまだ不明な点も多く、今後さらに解析が必要であろう。また、石浦氏は Kai 蛋白質が互いに物理的に結合することを生化学的に明らかにし、さらに Kai 蛋白質間相互作用が *kai* 遺伝子群の自己制御に関与している可能性を指摘した(17)。なお、KaiC 蛋白質のアミノ酸配列は重複構造をとっている。また、*kaiBC* 遺伝子については古細菌にも相同遺伝子が存在する。こうした知見は、今後生物時計の比較系統学・進化を考察するうえでとりわけ重要な材料となるだろう。

藍色細菌の実験系は、振動発生の分子機構を明らかにするためだけに威力を発揮するわけではない。それは Carl Johnson 氏が飛び入りで報告した、概日時計の環境適応度を評価した画期的な仕事にも明らかである(18)。概日リズムは、言うまでもなく地球上の昼夜交替に伴う環境変化への適応体制と考えられてきた。しかし実際には、それを明確に支持する実験例は殆ど皆無であった。たとえば、ショウジョウバエの *per*, *tim*, アカパンカビの *frq* などの時計変異体では概日リズムの表現型に様々な異常が見られるが、成長や寿命が明確に影響されることはない。Johnson 氏らは、石浦・近藤グループによって分離された概日時計変異株を用い、様々な光周条件下で生育速度を詳細に測定した。それによれば、時計変異株と野生株の生育速度を個別に測定しても殆ど差が見られなかった。ところが、野生型と突然変異株を1:1の比率で混合してから連続培養を開始すると、光周条件に応じてその比率が次第に変化し、一方が他方を圧倒するという現象が観察された。たとえば野生型と40時間周期の変異株を12時間明期-12時間暗期(12L:12D)条件下で培養すると、その光周条件に沿う周期をもつ野生型(約24時間周期)が生き残る。しかし20L:20D条件下で培養すると、今度は40時間周期の変異株が野生株を圧倒した。これは、概日時計が環境適応に密接に関与することを明確に示す非常に興味深い結果である。これは、多くの真核生物に比べて世代時間の大変短い藍色細菌だからこそ出来た実験である。なお、競合実験に抛らなければ野生株と変異株の生存価に差が見られないことは、

二つの株が共存するとき両者の間で何らかの相互作用(たとえば栄養分の奪い合いや生育阻害物質の分泌など)があることを意味しているだろう。具体的に何が起きているのか、これもまた大変興味深い問題である。

蛇足ながら、Johnson 氏は大変な日本びいきである。座長を務めたセッションでは、各講演前のシンポジストの紹介を持ち前の並外れた大声で(かなり大きな会場でも彼にマイクは全く不要であるどころか、危険である)、彼一流のユーモアを交えた日本語で完璧にやってのけ、大いに会場を湧かせてくれた。

<アフリカツメガエルは次世代型時計解析ツールになるか?: Carla Green 氏>

今回の発表で、特に私が面白く聞いたのは、Carla Green 氏による、アフリカツメガエル *Xenopus* を用いた新たな時計のモデル系開発の試みであった。Green 氏は両生類の視細胞の研究で著名な Joe Beshae 氏 (Wisconsin 大学) の下で 1996 年に両生類初の概日発現遺伝子 *nocturnin* をクローニングしている。この遺伝子は酵母の転写活性化遺伝子 *CCR4* とよく似ており、ロインジッパーモチーフを持つ。*nocturnin* はツメガエルの光受容細胞で主観的夜の早い時間帯でのみ発現し、今までに様々な生物で報告された数々の概日発現遺伝子の中でもとりわけ有数の実に見事なリズムを刻んでいるため、概日発現マーカーとして非常に好適である (19)。Green 氏は、最近開発されたばかりの *Xenopus* の形質転換技術を用い、新たな時計の分子生物学的実験系を構築しつつある。この系では、外来 DNA は受精前の精子染色体に直接組み込まれ、簡単に形質転換胚を得ることが出来る。しかも、受精後 4 日までに *Xenopus* の網膜時計は完全に分化して機能するので、遺伝子操作からリズムアッセイにかかる時間が非常に短くて済む。しかもサンプルを同時に大量に調整することが出来るという。Green 氏らは、*nocturnin* プロモーターに GFP (green fluorescent protein) レポーターを連結したものをを用い、光受容体特異的な cis 制御部位を同定することに成功した。さらに特定遺伝子

のドミナントネガティブ型の遺伝子断片の導入や過剰発現、アンチセンスの導入を容易に行えるため、脊椎動物の時計に関して詳細かつ巧妙な解析が可能になるという。また、Green 氏らはすでに *Xenopus* の *cry2*, *AA-NAT*, *per* などの相同遺伝子の概日発現を確認し、ルシフェラーゼレポーターを導入してこれら遺伝子の機能解析を行っていることも報告した。

さらに、この系は両生類のみに関わらず、哺乳類で相次いで報告されつつある時計遺伝子候補の解析にとりわけ強力な解析ツールになることはほぼ確実ではないだろうか。今後、そうした哺乳類の遺伝子を *Xenopus* の系に導入してリズムへの影響をアッセイする、という流れが出てくるに違いない。この意味で、彼女の現在の取り組みが、今後の時計機構解析を左右するブレイクスルーとなりうると感じたのは私だけではないだろう。むしろ *Xenopus* は発生生物学有数のモデル生物である。Green 氏らによる実験系は、生物時計の発生学的解析にも大いに貢献するに違いない。

<概日機構---Circadian Organization--の包括的解明に向けて: Michael Menaker 氏>

座長の Johnson 氏から「セイブツドケイノ、オヤブデス」と紹介された Michael Menaker 氏は、このシンポジウムの締めくくりとして、イグアナを用いた見事な生理学研究 (20) を紹介してくれた。Menaker 氏は細胞レベルから個体レベルに至る概日時計の統御構造に強い関心を持っている(本誌の山崎晋氏の報告を参照; 本誌, 1998 年, vol. 4(1), 9-21)。複数の概日時計が、どのように統合して個体レベルの概日機構を実現しているのかを研究する上で、イグアナは格好の材料という。Menaker 氏は、ポストクの Gianluca Tosini 氏(現 Morehouse 医科大学)とともに、恒常温度条件下では変温動物のイグアナにも体温変化の概日リズムが見られることを発見している。行動リズムと体温リズムが脱同調する個体がしばしば見られるため、体温リズムは行動リズムによって二次的に生じた現象ではなく、また、少なくとも二つ以上の概日振動体が存在することが示唆された。イグアナには松果体、頭頂

眼(parietal eye),そして網膜の三つの光受容能を持つ器官が存在する。そこで彼らはそれぞれがどのように行動・体温リズムに関与しているかを検証した。頭頂眼除去だけでは体温リズムは消失しないが、さらに松果体を除去すると体温リズムが消失した。しかし頭頂眼と松果体の除去では行動リズムは殆ど影響を受けなかった。しかがって、松果体は体温リズムの発現と制御の中枢であるのに対し、行動リズムに関してはそれほど重要ではないらしい。血中メラトニンのリズムも頭頂眼除去には影響されない。いっぽう、松果体除去によって血中メラトニン量は激減し、リズムも消失した。しかし、非常に興味深いことに、個別に器官培養された頭頂眼、松果体、網膜はいずれも明瞭なメラトニン放出リズムを示した。さらに、個別に培養された組織は相異なる温度補償性を示すそうである。こうした複数の振動体が、個体レベルでどのように統合され概日機構を実現しているのだろうか。具体的な研究はまだ始まったばかりである。

分子レベルの研究を唱ったシンポジウムが、スケールの大きな生理学研究の紹介で締めくくられたことはとても意義深い。現在細胞内振動機構の研究が華やかに行われているが、振動体同士のネットワーク、光受容系と時計機構との機能的な相互関係など、より高次の生理活動の営みを理解する上で、こうした *in vitro* と個体レベル双方を併用した研究が今後も重要な研究材料と知見、そして今後の大きな課題をもたらしてくれることは間違いないからである。

こうしてシンポジウムの内容を列挙してみると、(主として分子機構の解明に限ってすら)生物時計の研究の広がりか改めて感じられる。参加者の方々もこの分野が現在いかにホットなものであるか、よくおわかりいただけたと思う。ところで、私のような若造が改めて言うまでもなく、生物時計研究は本質的に分野横断的なものである。実際、今回のシンポジウムで参加した(分子機構を探っている)研究者たちは、単にベンチで遺伝子をいじっているのではなく、遺伝学、生理学、解剖学・組織学、リズムの自動計測機器・ソフト開発、光生物学、生化学、発生学といった様々なバックグラウンドを踏まえつつ分子レベルで画

期的な成果をあげておられる方々ばかりである。むしろ、遺伝子レベルの研究はそのデジタルな性格ゆえに、ともすればアナログ的な要素の強い生理的な複雑なふるまいを捨象してしまう危険性がないとは言えない。昨今のかかなり過熱気味の研究情勢の中で、私たち分子レベルの仕事に携わっているものは、(Menaker氏が、また冒頭で Gene Block氏が語ってくれたような)長年に渡る概日時計の(比較)生理学的成果や生態学的研究、また理論的数理的考察を含めた概日時計研究の多面性にしばしば立ち戻る必要があるだろう。

私見では、いくつかの部品について(相当の憶測を踏まえて)時計の振動機構モデルが提案されてきているとは言え、まだまだ振動機構にも入力系機構にもはっきりしない点が多い。たとえば、従来ショウジョウバエでは *per*, *tim* も転写リズムが振動発生の中核と提案され、*clock*, *bmal1* もそれをサポートするものとして登場した。その一方で、ショウジョウバエでは *per* の転写後制御や翻訳後修飾の重要性が最近にわかにクローズアップつつあり、今後大幅なモデルの変更もあり得そうな気配である。TTOモデルを最も見事に支持するデータを出しているアカパンカビでも、中島氏によれば説明のつかない観察事例(たとえば様々な代謝と時計機構との相互作用)がまだまだ沢山あるらしい。私たちが研究している藍色細菌でも、*kai* 遺伝子の発現制御ですべてが片づくことはあり得ないだろう。さらに、時計機構の様々な環境条件との関わりや、時計と出力系との具体的な接点となると、分子レベルではまだ殆ど手が付けられていないといっても過言ではない。幸いなことに、まだまだ私たちが研究すべき課題はたくさんあるわけだ。Dunlap氏がある総説の題名に記したように、昨年報告された数々の華々しい成果は、まだ "An end in the Beginning" でしかない。Menaker氏は私達に寄せたメッセージの中で次のように書いている。

「概日システムをさまざまなレベルで個別に研究することで、私達は今まで驚くほど素晴らしい成果をあげてきた。私達は今、とりわけ近年の分子レベルの研究のめざましい展開によって、より深い理解に踏み込むための有力な手段を手にするようになっ

ている。いまや、こうした個別の研究を統合し、統一的な概日機構の理解に向けて着手すべき時期に来ているのではないだろうか。」

まだまだ統一的な理解には程遠いだろう。それでも今回のシンポで見られた種・手法を超えた豊かな研究を見ていると、このいさか意気込んだスローガンにも、なるほど一定の説得力がある。

<参考文献>

- (1) Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S., and Young, M.W. (1998). The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase I. *Cell* **94**: 97-107.
- (2) Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Adodeely, M., Kloss, B., and Young, M.W. (1998). *double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**: 83-95.
- (3) Sangoram, A., Saez, L., Antoch, M., Gekakis, N., Stankis, D., Whiteley, A., Fruechte, E., Vitaterna, M., Shimomura, K., King, D., Young, M., Weitz, C., and Takahashi, J. (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: a *Timeless* ortholog and *mPER1* interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* **21**: 1101-1113.
- (4) Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N., and Okamura, H. (1998). A new mammalian *period* gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**: 167-176.
- (5) Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., and Yamamoto, S. et al. (1998). A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVLT. *EMBO J.* **17**: 4753-4759.
- (6) Takumi, T., Nagamine, Y., Miyake, S., Matsubara, C., Taguchi, K., Takekida, S., Sakakida, Y., Yamaguchi, S., Yagita, K., and Nishikawa, K. et al. (1999). A mammalian homolog of *Drosophila timeless*, highly expressed in the SCN and retina, forms a complex with mPER1. *Genes Cells* **4**: 67-.
- (7) Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Stankis, D., Gekakis, N., Steeves, T., Weitz, C.J., Takahashi, J., and Kay, S.A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK induced transcription of its own inhibitors, *per* and *tim*. *Science* **280**: 1599-1603.
- (8) Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namiyama, M., Honma, K., and Nomura, M. (1998). Circadian oscillation of *BMAL1*, a partner of a mammalian clock gene *Clock*, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **250**: 83-87.
- (9) Abe H, Honma S, Namiyama M, Tanahashi Y, Ikeda M, Yu W, Honma K (1999). Phase-dependent induction by light of rat clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* **66**:104-110
- (10) Abe H, Honma S, Namiyama M, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K (1998) Circadian rhythm and light responsiveness of *BMAL1* expression, a partner of mammalian clock gene *Clock*, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett* **258**: 93-96
- (11) Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namiyama M, Honma K (1998) Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci Lett* **250**: 157-160
- (12) Somers, D., Webb, A.A., Pearson, M., and Kay, S.A. (1998). The short period mutant *toc1-1* alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**: 485-494.
- (13) Somers, D., Devlin, P., and Kay, S.A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **282**: 488-490.

- (14) Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, Kay, S., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* **95**: 681-692.
- (15) 中島秀明(1998)「時計遺伝子アカハパンカビ」『生物時計の分子生物学』(海老原・深田編, シュブリンガー・フェアラク東京), pp. 28-37
- (16) Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.J., and Kondo, T. (1998). Expression of a clock gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**: 1519-1523.
- (17) Iwasaki, H. Taniguchi, Y., Ishiura, M. and Kondo T. (1999) Physical interactions among circadian clock proteins, KaiA, KaiB and KaiC, in cyanobacteria. *EMBO J.* **18**: 1137-1145
- (18) Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., and Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8660-8664.
- (19) Green, C. B. (1998) How cells tell time. *Trends Cell Biol.* **8**: 224-230
- (20) Tosini, G. and Menaker, M. (1998) Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. *J. Neurosci.* **18**: 1105-1114

U.S./Japan Workshop on Molecular Chronobiology に参加して

(1998年12月5日～7日、鈴鹿サーキットホテル)

吉村 崇

名古屋大学大学院 生命農学研究科

1998年12月5日-7日にかけて、U.S. / Japan Workshop on Molecular Chronobiology が NSF Center for Biological Timing と文部省国際学術研究の支援により鈴鹿サーキットホテルにおいて開催された。このワークショップは Dr. Gene Block (ヴァージニア大学) と海老原史樹文先生(名古屋大学大学院生命農学)をチェアとして前年のサンフランシスコに続いて行なわれた。今回はアメリカから9名、日本から41名の参加者があった。ところで鈴鹿サーキットで行なわれたことについて参加者の中では主催者が自動車好きなのは、などの憶測が飛び交っていたようであるが、そういうわけではない。アメリカからの参加者は日本通ばかりであり、彼らが一度も訪れたことのない日本人の心の故郷(?) お伊勢さんと海の幸を楽しんでもらおうという狙いがあったのである。また鈴鹿サーキットで

は自動車レースの最高峰、F1のレースが毎年開催されており、外国人宿泊者の受け入れ体制がしっかりしているということも開催地決定の要因となった。

さて肝心の会議であるが、やはり現在最もホットな時計遺伝子についての発表を中心に最新のデータなども飛び出し、熱いディスカッションが繰り広げられた(写真1)。最近この分野の関心は時計遺伝子に集中しているが、それ以外の発表も興味深いものが多かった。特に Dr. Menaker の発表は恒明条件下で飼育し、網膜が退化したアルビノハムスターでは概日光受容と季節繁殖における光への反応性が異なるというもので、概日光受容器とは別に季節繁殖のための光受容器の存在を示唆するものであった(写真2)。彼ならではの仕事に、異なる視点が重要であることを改めて考えさせられた。今回、日本からの発表者は若い人達が多く、良い経験に