総 説

ショウジョウバエを用いた概日測時機構解析の40年 −第2部　ショウジョウバエ再び−

伊藤太一[1)]、松本　顕[2)] ✉
1）九州大学大学院システム生命科学府
（現在の所属：Department of Neurobiology, Northwestern University）
2）順天堂大学　医学部　一般教育生物学

概日測時機構の分子レベルでの解析に関して、これまでキイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）が果たしてきた役割はきわめて大きい。前巻掲載の第1部では1970年代から21世紀初頭までの30年間の研究成果を振り返った。今回の第２部では、比較的最近になって新規に開拓された、あるいは、新たに注目を浴びるようになった研究分野や研究の方向性に関して概説する。まずは、我々が最近注目して解析してきた膜タンパク質による概日リズムの制御に関してやや詳しく紹介したい。次いで、最近10年ほどの間に開発された解析技術を用いた新しい研究の流れを概観することで、ショウジョウバエを用いた研究が今後どのように概日測時機構の解明に貢献していけるかについて考察する。

１．膜タンパク質と概日リズム

第１部で記した通り、これまでのショウジョウバエの概日リズムの研究は、転写翻訳に関わる遺伝子群の同定と解析を中心に発展してきた。実際に、第１部５．２で記した我々のRNAiスクリーニングから得られた時計遺伝子候補の大半も転写関連因子であった［１］。しかし、ショウジョウバエのような多細胞生物では、時計中枢を構成する細胞同士、また中枢から末梢への時刻情報の伝達があってこそ、個体内での時間的な秩序を保つことが可能になる。よって、転写翻訳関連因子と同様に、細胞膜に存在するタンパク質も概日リズムの形成に重要と考えられる。

１．１　Gタンパク質共役７回膜貫通型受容体

現時点では、膜タンパク質は主に時刻情報の出力系との関連で解析される傾向が強い。例えば、第１部４．３で紹介した出力系因子であるpigment dispersing factor（PDF）の受容体は2005年に３グループによって同時に同定された［２、３、４］。PDF受容体は構造的にはGタンパク質共役７回膜貫通型受容体に分類される。PDFの発現が時計関連細胞の中ではlateral neuron ventrals（LN_vs：詳細は第１部４．３および第１部図２参照）に特異的であるのに対し、PDF受容体の発現はLN_vsだけにとどまらず、それらのニューロンの投射先のひとつであるdorsal neurons（DNs）にも観察される［５、６、７］。PDFが出力系因子であることを考慮すれば、PDF受容体も時刻情報を中枢時計から末梢に伝えるために重要な機能を担っているといえる［２、３、４、８、９］。

１．２　イオンチャネル

Na^+/Ca^{2+}チャネルをコードしている*narrow abdomen*（*na*）は、時計関連の機能を果たすことが2005年に報告された［10］。*na*はLN_vsやDNsなどの時計ニューロンで発現しているが、突然変異体であってもそれらの時計ニューロンでの既知の時計遺伝子の発現量には変化がない。また、*na*突然変異体の表現型は主に予知活動の変化としてのみ表れる。このことから、この因子は出力系に関与すると推測されている［10］。これとは別に、2007年にはCa^{2+}依存性K^+チャネルをコードする*slowpoke*（*slo*）が出力系遺伝子として同定されている［11］。*slo*の突然変異体は無周期になるが、LN_vsやDNsなどの時計ニューロンでの時計遺伝子の発現量

✉akirarcb@sakura.juntendo.ac.jp（〒270-1695　千葉県印西市平賀学園台1-1）

に影響しないため、出力系に関与すると推測されている。実際に、*slo*の発現領域はLN_vsやDNsといった時計の中枢となる細胞ではなく、脳内にまばらに発現しており、*na*とは発現パターンに大きな違いがある［11］。つまり、同じ出力系の遺伝子といっても、概日測時機構の階層性から見ると、*na*は中枢からの直接的な出力に、*slo*はもっと末梢での制御に関与している可能性が高いのかもしれない。いずれにせよ、このように膜タンパク質は、もっぱら時刻情報の伝達に重要な因子として解析されてきた。

１．３　膜輸送体ABCトランスポーター

多くの生物においてその種類が最も多い膜タンパク質のひとつがABCトランスポーター（ATP binding cassette transporter）である。ABCトランスポーターは、ATPを加水分解して得たエネルギーを用いて物質の輸送を行う膜タンパク質で、キイロショウジョウバエには56個の遺伝子が存在すると、ゲノム解析から推測されている［12］。

我々は、これらを対象に、RNAiを用いた時計細胞特異的なスクリーニングを網羅的に行い、無周期を誘発するものを３つ、周期に影響を与えるものを５つ発見した［13］。その中のひとつ*Early gene at 23*（*E23*）のノックダウン系統はきわめて明瞭な長周期を示した。*E23*は第１部５．２で紹介したマイクロアレイ解析後のRNAiスクリーニングでも時計遺伝子候補として記載されていたが、概日リズムへの関与メカニズムの詳細は不明であった［１］。

１．３．１　*E23*とエクダイソン：第４のループ

*E23*は、もともとショウジョウバエの唾腺染色体の縞模様の中の23という領域に生じるパフの原因遺伝子として同定された［14］。昆虫のステロイドホルモンであるエクダイソンに応答して転写がすばやく活性化することからこの名前が付けられている。エクダイソンは脱皮ホルモンともよばれる。

我々は、*E23*が時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループの制御に不可欠であることを突き止めた［15］。その概要は以下のように要約できる（第２部図１）。まず、*E23*はエクダイソンによって転写が活性化される一方で、その産物であるE23タンパク質は細胞内のエクダイソンを細胞外に排出するABCトランスポーターとして機能する。つまり、細胞内エクダイソン量と*E23*発現量の間には、独自のネガティブフィードバックループ（第４のループ）が形成されている。一方、既知の時計遺伝子の多くと同様に、*E23*の発現はCLK/CYCの周期的な制御を受ける。さらに、時計遺伝子*vri*の発現も*E23*と同じくCLK/CYCとエクダイソンの両方によって制御されており、エクダイソンが細胞内に豊富に存在すると*vri*の発現レベルが上昇する。VRIタンパク質が過剰に発現すると、*Clk*に対するシビアな発現抑制が生じる。エクダイソンとE23による第４のループは、こうして*Clk*ループと密接に連動して機能しており、*E23*を強力にノックダウンすると無周期の表現型が、弱いノックダウンでは長周期の表現型が誘導される。逆に、*E23*の構成的な強制発現では無周期の表現型が誘導される。よって、第４ループは概日振動の発振に不可欠であると考えられる。

１．３．２　第４ループの発見意義

膜タンパク質であるABCトランスポーターを対象とした我々の研究は、思いがけず第４のループの発見に結び付いた。我々はこの発見に対して、新たな時計遺伝子の発見ということ以外に２つの意義を見出している。

まず、第４のループはエクダイソンという細胞間情報伝達因子を介すため、時計関連細胞間での時刻情報の伝達に直接的に関与する可能性を秘めている。これは、転写翻訳という細胞内過程のみで成り立つ既知の３ループとは対照的な性質である。第４ループが本当に時刻情報の細胞間伝達に関与しているならば、自律振動の形成メカニズム自体が、時刻情報の入力系および出力系を包含して成立していることになる。自律振動体を入力系や出力系とは分離

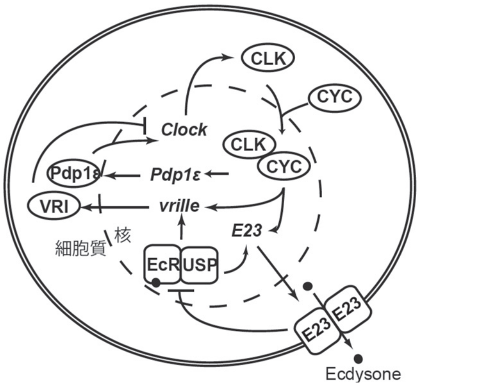

図１　E23ーエクダイソンのループ（第４ループ）
細胞内に入ったエクダイソンは、核内受容体EcR/USPの二量体に結合し、*E23*や*vri*の転写を活性化する。一方で、E23タンパク質は細胞内のエクダイソンを細胞外に輸送する。*E23*と*vri*の転写はCLK/CYCによっても調節されており、第４ループは*Clk*ループと密接に連動して働く。

して考えていた旧来の単純な図式は変更を迫られ、新規のモデルによって概日測時機構を捉え直すことが今後必要になるかもしれない。この可能性を認識する契機となった点が、我々の考える1つ目の意義である。

次に、膜タンパク質は出力系との関連で解析されることが多かったが、*E23*の発見により、振動形成に不可欠な膜タンパク質も存在することを示せた。今後、いったん転写翻訳ループから離れ、別の視点からアプローチすることで、転写翻訳関連因子以外の重要因子が見つかってくる可能性がある。その先例を示した点が２つ目の意義であると考えている。

１．３．３　エクダイソンと概日測時機構の関連性―今後の課題

これまでにも、キイロショウジョウバエ以外の昆虫では、エクダイソン量が概日リズムを示すことは指摘されていた［16、17］。ショウジョウバエでもエクダイソンと概日測時機構との関連性を考える上で興味深い報告がいくつかある。幼虫や蛹の前胸腺では時計遺伝子が強く発現していると報告されているが［18］、前胸腺はエクダイソンの合成や放出に関わる器官で、羽化リズムの成立にも重要なことがわかっている［18、19］。羽化リズムという出力系に、どのようにエクダイソンが関与しているのか、大いに興味の湧くところである。また最近、単離培養した前胸腺を用いたPER/TIMの染色やカルシウムイメージングが行われ、光による応答がPERとTIMで異なることが示された［20］。エクダイソンが概日リズムの入力系や自律発振系に何らかの作用を及ぼしている可能性があればおもしろい。

以上は、幼虫や蛹における報告例であるが、成虫のリズムに対するエクダイソンの機能に関しての研究例はほとんどなく、未開拓の研究分野であった。しかし、最近になって、成虫の睡眠にエクダイソンが関与している可能性が指摘された［21］。睡眠という新規の研究領域にエクダイソンが関係していたことは大変に興味深く、今後の進展に注目したい。

２．転写翻訳フィードバックループを超えて

ショウジョウバエを用いた概日リズム研究では、第１部２．３の５大テーマの筆頭「発振メカニズムの解明」に関しては、ほぼ一段落したという意見が大勢を占めているとみて間違いない。もちろん、今後も時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループ制御に関する研究はさらに精緻に進められていくことであろう。実際、大物因子はほぼ同定しつくされたと思われていた中、最近になって、転写翻訳ループに必須な因子として核内受容体*unfulfilled*が新たに同定された［22］。脳内の時計細胞の中でも、M振動体を構成するs-LN_vsという数個の細胞群（詳細は第１部4.3および図２参照）で特異的に機能しており、後ほど2.2で詳述するが、新規技術を用いることで初めて達成された成果と言える。

これまでは、時計遺伝子の転写調節や、時計タンパク質に対するリン酸化や脱リン酸化、ユビキチン化などの修飾因子の研究に注目が集まっていたが、2011年にはLimらによって翻訳調節因子*twenty-four*（*tyf*）が発表され、2013年にはTYFのパートナーとしてATAXIN-2がLimとAllada、およびZhangらの２つのグループによって同定された［23、24、25］。転写翻訳フィードバックループの制御という大枠の中には留まっているが、今後の発展が期待できる領域のひとつである。

２．１　非転写翻訳振動

最近、植物や哺乳類を使った実験系で話題になっている、転写翻訳を介さない振動メカニズムの追求は非常に魅力的な新規テーマである［26］。

実は、かなり以前からper^0にも同調可能な光サイクルの周期に限界があることを根拠として、*per*の関与しない発振メカニズムの存在が予測されていた［27］。さらに、per^0に限らず、無周期とされるさまざまな系統でも、しばしばサーカディアンレンジ（24±4 hr）に明瞭な周期成分が検出される事例が、ショウジョウバエ研究者の間では密かに噂されていた。しかし、それが概日リズムの諸性質を満たすものかを厳密に検証した者はいなかったし、何より、表立ってこれを（特にショウジョウバエ研究者以外の前で）話題にするのは、一種のタブーのような雰囲気すらあった。そのような理由からか、転写翻訳フィードバックループ仮説から逸脱するかに見える実験結果を記載したショウジョウバエ論文は、我々が知る限り、わずかに次の２報のみである。まず、YangとSehgalは、per^{01}；tim^{01}二重突然変異をバックグラウンドとして、それらの時計遺伝子のいずれか一方でも構成的に強制発現するだけで（転写レベルの振動が無くてもタンパク質レベルの振動がs-LN_vで生じれば）、ある程度の割合で活動リズムが回復することを示している［28］。また、Collinsらは、cry^b突然変異のバックグラウンドではper^0でもLDで予知活動を示すことを報告している（ただ

し、DDでは無周期だったためか、この予知活動をTIMの未知の機能に帰結する方向で議論を行っており、iconoclastic observationなどの単語を並べている割には歯切れが悪い）[29]。日本でも、低温条件では、比較的再現性良く一定の割合で*per*^{0}個体が明瞭な周期性を示す報告例はあるが、現象論に終始するだけで明瞭な結論は得られていない［30］。

これとは別に、ショウジョウバエをはじめとする昆虫のクチクラ形成におけるper-less振動に関する研究が進展している［31、32］。しかし、その分子メカニズムは依然として謎のままである。こうした未完のテーマも、転写翻訳を介さない振動メカニズムの解明によって、一挙に解決されるのではないかと期待される。

２．２　温度補償性

発振メカニズムの解明自体は、ほぼ一段落したとはいえ、周期の温度補償性の成立原理の解明は、今後に残された大きな研究テーマのひとつといえよう。近年、シアノバクテリアや哺乳類の実験系で、リン酸化過程がこの性質を生み出すために重要な役割を担っているという報告がなされている［33、34、35］。ショウジョウバエでは温度補償性に関するいくつかの突然変異体や自然集団での変異の報告があるのみで［36、37、38］、分子レベルでの解析は全く手付かずの状態にあるといっても過言ではない。これは、新しモノ好きで、どの分野にでも首を突っ込みたがるショウジョウバエ研究者にしては珍しい状況といえる。大きな要因のひとつは、ショウジョウバエでは、自律的な概日振動を示す細胞培養株が確立されていないことだと考えられる。そもそもショウジョウバエの利点はin vivoでの解析系が突出して発展しており、例えば、哺乳類と比べて、比較的短時間でin vivoでの実験結果が得られることである。しかし、温度補償性の解明には、in vivoの実験だけでなく、むしろ培養細胞を用いたin vitroに近い実験系の方が好ましい場合がある。自律的な概日振動を示す細胞培養株の確立は、多くのショウジョウバエの概日リズム研究者に待ち望まれているが、我々を含めた複数の研究室での長年の努力にも関わらず、満足できる培養細胞株の樹立には至っていない。こうした実験系の確立は、大きなブレークスルーにつながることが期待できる。

温度補償性の成立原理の解明の先には、概日時計の頑強性と安定性の成立原理の解明という、もう一段ハードルの高い課題がひかえている。これらの、積み残された難しい課題の完全解決には、ショウジョウバエの実験系といえども、まだ多くの時間を必要とするかもしれない。しかし、これは逆に考えれば、今が新規参入の絶好のチャンスであるともいえる。

２．３　時計情報の出力系の解明

発振メカニズムの解明がおおすじでは一段落した近年、ショウジョウバエの概日リズム研究のトレンドが出力系因子の解明になっていることは、当然といえるかもしれない。我々が膜タンパク質に着目したのも、そもそもは、まさにこの流れの中に位置づけられる。さらに、第１部で紹介したようなショウジョウバエの遺伝学的解析技術の向上により、出力系に関わる因子を、巧妙に解析可能になってきたことが、この傾向に拍車をかけている。

例えば、Konopkaの時代には、突然変異のスクリーニングには個体レベルでの周期異常を観察する以外になく、また、同定された時計遺伝子の働きを、時計の中枢と末梢で区別することは非常に難しかった。ところが現在では、時計の中枢は正常なままで、ある遺伝子機能を末梢組織だけで阻害する、あるいはその逆などの操作を施し、何が起こるかを容易に観察することができるようになっている。第１部３．４で記したMARCM法［37］などの活用により、以前は微小手術でしかできなかった解析と遺伝学的な解析を、一挙に細胞・組織レベルで実行可能な環境が整って来たわけである。さらに、時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループ制御に関する莫大な知見も蓄積されてきた。それだけでなく、ショウジョウバエの発生学や神経生物学で培われた、ニューロン１つ１つの投射パターンの詳細なマップや、脳の特定の領域でどのような神経伝達物質が働いているかといった知見も利用可能となってきている。

概日リズムの出力系の解析の進展は、とりもなおさず概日測時機構の階層性の解明にもつながる。将来的には、ショウジョウバエ１個体の中での時刻情報の処理が、さまざまな組織・細胞の連携によってどのように統御されているか、その全体像が明らかにされるであろう。

２．４　micro-RNA関連機構

この流れの中での典型な解析例は、最近発表された２つの論文にみることができる。また、この２つの論文はともにmicro-RNA（miR）の機能に着目し

ているという意味でも新しい研究コンセプトから生み出されたものといえる。

2012年のLuoとSehgalの論文は、時計細胞特異的な遺伝子の過剰発現誘導によるスクリーニングを発端とした順遺伝学的な研究である［40］。miR-279の過剰発現により無周期の表現型が誘導されたが、これが中枢時計に効いているのか出力系に効いているのかを選別する必要があった。そこで、組織特異的に遺伝子発現を調節できる系統を駆使し、さらに抗PER抗体を用いた免疫組織染色による細胞レベルでのリズム観察が行われた。その結果、中枢時計でのPERの発現に変化がないことが突き止められ、miR-279の作用は出力系であると推測された。miR-279の標的遺伝子を同定し、その発現領域を絞り込むことで、最終的にはmiR-279の標的遺伝子のターゲットはフィードバックループの構成因子ではなく、JAK/STATの系であることも突き止められた。つまり、同定されたmicro-RNAは、時計の中枢そのもので機能するのではなく、概日時計の階層性からすると、中枢から一段下位の役割を果たす組織において、中枢からの時刻情報を修飾して末梢へと流す役割を果たしていると結論付けられた。

大御所Rosbashのグループも、最新の解析技術を駆使した研究を発表している［41］。彼らは、次世代シークエンサーを用いたRNAシークエンスによって、発現に概日振動を示すmicro-RNA（miRNA959-964）を逆遺伝学的に同定した。その後、この領域からmiRNA959-962の領域のみを相同組換えで欠損させた系統を準備した。これをバックグラウンドとして、さらにGal4を挿入した突然変異体を用いた解析を加えている。miRNA959-962の発現部位を特定してみると、それらは中枢ではなく脂肪体（機能的には哺乳類の肝臓とよく類比される）で発現していた。このことから、彼らは、miRNA959-962は出力系で機能していると推測し、最終的には代謝、免疫系との関連性を示唆する結果を得ている。

前者が順遺伝学、後者が逆遺伝学的な方法論を用いているという違いはあるにしても、どちらの研究も高度に発展した遺伝学的な手法、特に遺伝子発現の組織特異的な調節方法を駆使した研究である。さらに、ショウジョウバエでは中枢神経系での神経投射パターンの詳細が解明されているからこそ可能であった研究である点も見逃せない。くり返しになるが、micro-RNAという新しい因子に着目した点でも、新しいコンセプトに基づく研究であるが、さらに、micro-RNAの標的となる因子まで同定し、その因子の機能解析を含めて１報の論文として発表していることは、今後の研究および論文発表のスタイルを考える上で非常に参考となる。ショウジョウバエの分野においては、単なる因子同定とその機能の簡単な解析でひと仕事まとめる、という時代はすでに終わったと見るべきかもしれない。

２．５　新規解析技術の活用

ショウジョウバエ独自の解析技術の向上とは別に、次世代シークエンサーの普及によって、micro-RNAやnon-coding RNAといった非翻訳RNAの研究が、以前よりも格段に行いやすくなっている。Rosbashのグループは、前述以外にもこの技術を用いたリズム関連論文を発表しているし［42］、Nitabachのグループも脳内で周期的に発現しているトランスクリプトの網羅的な同定をRNAシークエンスで行っている［43］。

これに加えて、ショウジョウバエの利点である遺伝学的手法を活かせば、きわめて限定的に特定の組織・細胞を狙ってRNAを精製し、上記の解析に供することも可能である。たとえば、脳内の時計ニューロンだけを選別するためにGAL4-UAS法を用いて特異的にGFPを発現させ、これを指標として時計ニューロンを解剖によって１本ずつ選り分けて採集し、遺伝子発現を比較した事例がある［６］。ショウジョウバエ研究者にとっても、これは驚くほどの職人技であるが、より簡便に大量のサンプルを扱う方法としてFACS（fluorescence activated cell sorting）を行う方法もすでに確立されている［44］。これを駆使すれば、特定のニューロンで発現するRNAシークエンスが原理的に可能である。前述の核内受容体unfulfilledの発見もこの技術を駆使した成果といえる［22］。類似の方法を使った研究成果はこれから続々と発表されてくるはずである。

２．６　概日リズムの生理・生態学的意義づけ

概日リズムの生理・生態学的な意義の解明という課題は、第１部２．３でショウジョウバエを用いた時間生物学の５大研究テーマの最後の項目として挙げたが、実は、これまでは、ややおろそかにされ気味であったと言わざるを得ない。ショウジョウバエが、ミツバチの時刻記憶や鳥の渡りのような行動を示せば、概日リズムの生理・生態学的意義を考える上で格好の研究対象と成りうるが、そのような行動はまだ発見されていない。よって、太陽コンパス定

位への概日測時機構の関与を探ること［45］など、現時点では諦めるほかない。休眠に関しても、残念なことにキイロショウジョウバエは明瞭な表現型を示さず［46］、先導的な役割は果たせていない。ただし、第１部４．３で示したように、eveningおよびmorning（E-M）振動体の役割分担が、季節に依存した日長や温度の変化（光周期）に対する柔軟な同調能に重要なことが明らかにされつつあり［47、48］、この分野の進展具合によっては、状況が打開される可能性は高い。

そもそも概日リズムを生理・生態学的に意義づけることは、ある意味で、生きているとは何かを問うのに等しく、本質的に難しい問いである。よって、ショウジョウバエの利点を活かしてこの課題に分子レベルで取り組むには、概日振動の自律発振、同調、出力系に関する分子メカニズムや、個体内での概日測時機構の階層構造に関する知見の充分な蓄積が前提となる。ショウジョウバエの分野といえども、まだ機が熟していなかったという見方もできるかもしれない。その中で、概日測時機構による交尾時刻の制御に関する研究は、社会行動や適応という進化・生態学的な視点から概日リズムの重要性を考える端緒となるものであり、今後再び注目を集める可能性を有している［49、50］。また、最近になって、実験室内と自然界（を模した実験環境）で概日測時機構の振る舞いを比較した研究がヨーロッパのグループから立て続けに発表されている［51、52］。概日リズムの適応的意義を探ることを志向した研究は、今後さらに増えてくることと思われる。

さらに踏み込んで、概日測時機構が進化的にどのように生じ、どのような機能上の洗練（選択や淘汰）を受けてきたかについての研究は、個々の時計遺伝子に関する分子進化的な研究［53、54］を除けば、我々が知る限り、ショウジョウバエを用いた本格的な解析は行われていない。しかし、ごく最近、キイロショウジョウバエの近縁種で時計遺伝子群の発現組織を比較した研究が発表された［55］。ドイツのHelfrich-Försterのグループの研究で、ヨーロッパにおける進化・生態学的な視点へのシフトの動きが読み解ける。概日測時機構のシステムレベルでの進化に関して、先鞭をつける研究が日本からも発表されることに期待したい。

概日リズムの生理・生態学的な意義の解明というテーマの追及は、また一方で、応用的な課題への発展の可能性も蔵している。概日測時機構は非常に多くの生理現象に関与するため、ショウジョウバエで多くの知見が明らかになれば、ヒトの疾患の解明に役立つ情報を提供できるようになるであろう。ショウジョウバエの利点は、昆虫特異的な基礎研究だけにとどまらず、遺伝子という共通の素材を通して、ヒトの疾患研究のモデルとしても使えることにもある。ハンチントン病や脊髄小脳変性症などの神経変性症においては、ショウジョウバエがモデル動物として使用されてきた実績があり［56､57］、すでに、この方向性での概日リズム関連研究も開始されている。例えば、キイロショウジョウバエを用いた、加齢や神経変性疾患と概日リズムとの関連性に関する研究は、比較的目新しい研究領域に属するが、すでに興味深い成果をあげている［58、59、60］。また、厳密な意味では時間生物学とは若干分野が異なるかもしれないが、第２部１．３．３でも少しふれたショウジョウバエの睡眠に関する研究［61､62､63］も、ヒトの健康維持や脳機能の解明と密接に関連しており、この流れの中に位置付けられるものであろう。

３．ショウジョウバエ研究の今後

以上、第２部では最近10年間のショウジョウバエでの研究成果を概観し、現在、拓かれつつある研究領域について紹介した。さらに、いまだ手つかずの研究方向に関しても、我々の知識や理解の及ぶ限りでの考察を試みた。

今後、ショウジョウバエを用いた概日測時機構の研究はどのように進展していくだろうか。おそらく、しばらくの間は、大きく次の２つの方向に向かう研究が主流になると予想される。ひとつはショウジョウバエにおけるさまざまな出力系の解明である。もうひとつは、温度補償性の成立原理や概日測時機構の適応的意義など、本質的に解決の難しい課題へのチャレンジである。ただし、前者は個別の生理現象に密着しているだけに、その遂行には、手間と時間、根気が必要であるが、研究結果の普遍性という観点からは、課題の重要性に比して、ショウジョウバエ以外の分野に与えるインパクトがやや弱くならざるをえない。後者は、至近要因にしろ、究極要因にしろ、ひとたび結果が得られれば、他分野にも大きな影響を与えることは必至であるが、クリアな結論を得ること自体が難しい。これが一種の閉塞感として、しばらくはショウジョウバエのリズム研究分野に重苦しくのしかかり続けるかもしれない。

この状況は、ある意味で、ショウジョウバエで*per*突然変異体が分離される直前、約40年前の時間

生物学分野と重ね合わせることができるかもしれない。いろいろな生物の示す、さまざまな概日リズムやその特徴に関して、多くの知見が精力的に集められつつあり、現在の我々から見ても高度でエレガントな解析も行われていたが、しかし、決定的な「何か」あるいは「コアとなる概念」が欠けていた時代である。もちろん著者達はその時代には居合わせていないので、諸先生方のお話を聞いての想像である。例えば、リズム分野にも詳しいあるショウジョウバエ分野の先生は、学生時代にKonopkaとBenzerの論文［64］を目にした瞬間「やられた！本当に突然変異が取れたんだ！」と衝撃が走ったという。別の先生によると、当時は「概日リズムは多因子形質であり、強力な表現型の突然変異を分離することは不可能、ショウジョウバエ遺伝学には出番がない」という、いま考えてみると根拠のない常識があったらしい。生態学の分野から参入された時間生物学の大家の先生は「これからは生態学すら遺伝子の時代か…と思いましたね」と感慨深げに話されていた。

時計遺伝子の発見は、当時の常識や既成概念、一部の研究者が感じていた閉塞感を吹き飛ばす強烈なインパクトを持っていた。その後の研究パラダイムのシフトを促したといってもよい。現在のショウジョウバエ分野で渇望されているのは、まさにこういったパラダイムシフトを誘発するような、これまでとは全く違った新しい視点・新しい研究コンセプトの導入ではないだろうか。ひょっとすると、その核となる発想は、すでに思いがけないところにいくつか転がっているかもしれないし、いま現在、芽吹きつつあるのかもしれない。

第１部２．３でもふれたが、時間生物学における大きな研究テーマは不変である。古くから提唱されてはいるが、未解決のまま残された課題はいまだに多い。今後も、ショウジョウバエの分野で次々に開発される新規の遺伝子操作技術や関連知見を背景に、これらの課題は徐々に解明されていくことと思われる。しかし、分子レベルでの解析技術が大幅に進歩して来た今だからこそ、古典的な知見や課題に対して、現在の知見と技術を踏まえた上で、新しい視点から解析し、その結果を新しい視点から解釈しなおすことによって、新たな飛躍につながる可能性が大いにある。再び、研究にワクワク感が戻ってくることを期待したい。

４．おわりに　―究極の理解にむかって―

最後に、はるか将来のことになるかもしれないが、概日測時機構の究極の理解に向けて、どのようにショウジョウバエの実験系が貢献可能かを考察して、この総説を終わりたい。

ヒトが自然現象を理解するとき、人為的にその現象を再構成できるようになって、はじめて本当の意味で理解したことになるという考え方がある。概日測時機構の解析に関してはどうであろうか。ヒトが本当に概日測時機構を理解したかの最終証明のためには、人工的に設計した因子群を使って、生体が元来持っている概日測時機構を完全に補償できる人工の分子ネットワークを、in vivoで再構成することが必須となるであろう。このようなことを議論するのは、非常に空想的でこの場にはふさわしくないという誹りは免れえないと思うし、百歩譲って空想をお許しいただいても、時間生物学の研究課題というよりも、最近勃興してきた合成生物学の守備範囲［65］であると強く感じられる方々が大半だとは思うが、あと少しなのでお付き合いいただきたい。

もしも実際にこのプロジェクトが実行される場合は、まず、生体外で人工因子群が設計・作製されるだろう。設計には、概日測時機構の発振原理のみならず、さまざまな入力系、多くの生理現象に対する出力系に対応するため、それらに関する広範で精緻な莫大な量の知見が必要とされるに違いない。因子の作製のために使われる素材は、我々の知るDNAやタンパク質だけとは限らないかもしれない。因子が作製できれば、概日測時機構をいったん破壊した個体にこれらの因子群を導入し、機能させる段階に入る。個体の示すリズム現象や個体内の時間的秩序がどのように回復されるかが試金石となる。数多くの因子を扱うために、遺伝子導入作業を幾度となく繰り返す必要があるに違いない。もちろん、１回の試行だけで成功することは考え難い。因子設計からの練り直しが何度となく必要になるだろうし、失敗を糧として新たな知見が得られることも多いと思われる。

こうしたプロジェクトのプラットフォームとなる実験系は、どのような条件を満たしている必要があるだろうか。まずは、遺伝子導入技術や遺伝子操作技術が発達していることが必須である。さらに、多くの生理学的知見が蓄積されていること、実験に供されるのが動物ならば、神経回路のマップが完備されていることなども必須条件となる。さまざまな生理現象や行動における概日リズムの回復を指標にするため、それらのリズムの計測技術が発達している

ことも重要である。因子群を組込む際のバックグラウンドとなる無周期系統など、突然変異体も豊富に準備できると申し分ない。

プロジェクトの初期段階では、酵母などの単細胞生物や培養細胞を使用するのが定石と考えられるが、究極の証明には、身近な多細胞生物を使った研究が必須となるに違いない。一方、このような野心的な取り組みでは、初期の段階からあまりにヒトに近い生物を使うと、倫理的な問題が不必要に大きくなる懸念がある。ここまで考えを進めてみると、このプロジェクトの実験プラットフォームとして採用されるべき候補の筆頭は、いまのところキイロショウジョウバエをおいて他にない、と我々は思う。

おそらく、時間生物学分野におけるショウジョウバエは、ヒトが本当に概日測時機構を理解したかを最終的に証明する日まで重要なモデル生物であり続け、そのプロジェクトの成功をもって、使命を終了すると考えられる。ショウジョウバエの時代は終わったと言う声を最近よく耳にするが、その日まで、まだまだ活躍の場は残っている、あるいは、その日にむかってさらに広がりつつあると信じたい。

補遺

前巻冊子体に掲載された第１部図２に誤りがありました。時間生物学会ホームページに掲載されたPDF版では正しい図に差し替えられておりますので、ご参照ください。

引用文献

［１］Matsumoto A,et al: Genes Dev21: 1687-1700 (2007)
［２］Mertens I, et al:Neuron48: 213-219(2005)
［３］Lear BC, et al:Neuron48: 221-227(2005)
［４］Hyun S, et al:Neuron48: 267-278(2005)
［５］Im SH, Taghert PH: J CompNeurol518: 1925-1945(2010)
［６］Kula-Eversole E, et al: ProcNatlAcadSci USA 107: 13497-13502(2010)
［７］Shafer OT, et al: Neuron58: 223-237(2008)
［８］Grima B, et al: Nature431: 869-873(2004)
［９］Shafer OT, Taghert PH: PLoS One4: e8298 (2009)
［10］Lear BC, et al: Neuron48 965-976(2005)
［11］FernándezMP, et al: ProcNatlAcadSci USA104: 5650-5655(2007)
［12］Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R: Genome Res11: 1156-1166(2001)
［13］Itoh TQ, Matsumoto A:Appl Entomol Zool47: 79-86(2012)
［14］Hock T, et al: ProcNatlAcadSci USA97: 9519-9524(2000)
［15］Itoh TQ, Tanimura T, Matsumoto A: Genes Cells16: 1159-1167(2011)
［16］Steel CG, Vafopoulou X: Comp BiochemPhysiol A144: 351-364(2006)
［17］Polanska M, et al: J Insect Physiol55: 426-434 (2009)
［18］Plautz JD, et al: Science278: 1632-1635(1997)
［19］Myers EM, Yu J, Sehgal A: CurrBiol13 526-533(2003)
［20］Morioka E, Matsumoto A, Ikeda M: NatComm3: 909(2012)
［21］Ishimoto H, Kitamoto T: Genetics 185: 269-281(2010)
［22］Beuchle D, Jaumouille E, Nagoshi E: CurrBiol22: 1221-1227(2012)
［23］Lim C, et al: Nature470: 399-403(2011)
［24］Lim C and Allada R: Science 340: 875-879 (2013)
［25］Zhang Y, et al: Science 340: 879-882(2013)
［26］O'Neill JS, et al: Nature 469: 554-558(2011)
［27］Helfrich C, Engelmann W: Z Naturforsch42C: 1335-1338(1987)
［28］Yang Z, Sehgal A: Neuron 29: 453-467(2001)
［29］Collins BH, et al: ProcNatlAcadSci USA 102: 19021-19026(2005)
［30］松本顕：時間生物学　8：11-15(2002)
［31］Ito C, et al: ProcNatlAcadSci USA105: 8446-8451(2008)
［32］Ito C, et al: JBiol Rhythms26: 14-23(2011)
［33］Tomita J, et al: Science307: 251-254(2005)
［34］Nakajima M, et al: Science308: 414-415(2005)
［35］Isojima Y, et al: ProcNatlAcadSci USA106: 15744-15749(2009)
［36］Rutila JE, et al: Neuron17: 921-929(1996)
［37］Sawyer LA, et al: Science278: 2117-2120(1997)
［38］Matsumoto A, et al: Mol CellBiol19: 4343-4354 (1999)
［39］Lee T, et al: Neuron25: 307-316(2000)
［40］Luo W, Sehgal A Cell148: 765-779(2012)
［41］Vodala S, et al: Cell Metabol16: 601-612(2012)
［42］Rodriguez J, et al: ProcNatlAcadSci USA110:

E275-284(2013)
[43] Hughes ME, et al: Genome Res22: 1266-1281 (2012)
[44] Nagoshi E, et al: NatNeurosci13: 60-68(2010)
[45] Reppert SM, Gegear RJ, Merlin C: Trends Neurosci33: 399-406(2010)
[46] Saunders DS Henrich VC Gilbert LI: ProcNatlAcadSci USA86: 3748-3752(1989)
[47] Stoleru D, et al:Cell129: 207-219(2007)
[48] Yoshii T, Rieger D, Helfrich-Förster C: Prog Brain Res199: 59-82(2012)
[49] Sakai T, Ishida N: ProcNatlAcadSci USA98: 9221-9225(2001)
[50] Lone SR, Sharma VK: PLoSOne6: e28336 (2011)
[51] Menegazzi P, Yoshii T, Helfrich-Förster C:J Biol Rhythms27: 433-442(2012)
[52] Menegazzi P, et al: JBiolRhythms28: 3-14 (2013)
[53] Ousley A, et al: Genetics. 148: 815-825(1998)
[54] Nishinokubi I, et al: Gene 307: 183-190(2003)
[55] Hermann C, et al: J Comp Neurol 521: 367–388(2013)
[56] Sipione S, Cattaneo E: MolNeurobiol23: 21-51 (2001)
[57] Hirth F: CNS NeurolDisord Drug Targets 9: 504-523(2010)
[58] Rakshit K et al: ChronobiolInt29: 5-14(2012)
[59] Krishnan N, et al: Neurobiol Dis45: 1129-1135 (2012)
[60] Umezaki Y, et al: JBiol Rhythms27: 423-432 (2012)
[61] Kume K et al: J Neurosci 25: 7377-7384(2005)
[62] Sehgal A, Mignot E: Cell 146: 194-207(2011)
[63] Ueno T, et al: Nat Neurosci15: 1516-1523 (2012)
[64] Konopka RJ, Benzer S: ProcNatlAcadSci USA68: 2112-2116(1971)
[65] Sprinzak D, Elowitz MB: Nature438: 443-448 (2005)