

## 目次

巻頭言	2
第4回日本時間生物学会学術大会の開催のご案内	4
第3回日本時間生物学会学術大会大会報告	5
藍色細菌の概日時計	6
アカパンカビの時計遺伝子	25
脊椎動物の時計遺伝子	30
第1回 AsiaPacific Pineal Meeting	46
新入会員	47
記事の訂正	49
会員登録内容の変更	50
96年会計報告	51
各種委員会委員	52
第3回日本時間生物学会運営委員会記録	53
第3回日本時間生物学会総会	54
事務局より	54

## 巻頭言

「動物の周期活動の研究を始めた頃」

森 主一

京都大学名誉教授

私が京都帝国大学理学部動物学科に入学したのは、1932年(昭和7年)4月であった。当時「動物生態学」の講義が正式に行われていたのは、国立大学の中では京都帝国大学だけだったので、それにあこがれての入学であった。3年になり、卒業論文の題目として、故川村多実二先生から与えられたのは、琵琶湖岸に棲むヤマトカワニナという巻貝の行動に関する問題であった。貝は岩のごろごろ転がった湖岸に、暖かい季節には多数群れているのに、冬になると消えて見えなくなってしまうのが、その理由を調べてみよ、というものであった。

そこで毎日この貝の行動を観察した結果、その原因が二つあることが分かった。一つは季節移動で、秋になって水温が下がると、湖の深みに多少移動し、岸から姿が見えにくくなることであった。これははじめから予想されたことであった。今一つ新しいことは、この貝は朝日が出て明るくなると岩の上に出て活動するが、日が暮れて暗くなると岩の下にもぐって休息する；そのために後半夜から早朝にかけては姿が見えなくなるのは、なにも冬に限ったことではなく、夏でも後半夜から早朝にかけては姿が見えなくなるので、即ち著しい日周期活動をすることが分かったのである。この事実の発見が私を日周期活動という、自然の生物の昼夜を棲み分けた生活実態の研究に入らせるきっかけとなり、その後各種の動物について手あたり次第に日周期活動を調べることになった。

ところが時はちょうど太平洋戦争の前夜にあたり、私は1937年大学院2年の時、赤紙召集を受けて戦場に引き出され、1942年に除隊されるまで、大学院の大切な5年有余の期間、研究を中断せざるをえないことになった。

さて研究室に帰って何をやろうかと思っていたところ、川村先生から海の生物を扱ってみてはどうかというお話があった。早速瀬戸臨海実験所に行って各種の動物を観察してみた結果、ウミサボテンという腔腸動物の著しい日周期活動が目に入り、その後この研究に熱中することになった。当時は大戦中で、英語は敵性語として使用を禁じられていたので、研究結果の発表はすべて日本語で行った。1945年の敗戦後も、もちろんこの研究を続けた。たまたま1960年 New York 郊外の Cold Spring Harbor の生物学研究所から、量的生物学の第25回シンポジウムを、主題を生物時計(Biological Clocks)として開くので、きて講演をしてほしいという招待状を受けた。この集会を組織したのは、C. S. Pittendrigh を主任とし、J. Aschoff, V. G. Bruce, E. Bünning, D. R. Griffin, J. W. Hasting の、錚々たる人たちであった。このシンポジウムは当時の世界の生物学会の第一級のものであったので、突然のことで大変驚いた。私の仕事の基本的な部分は、前に述べたように日本語で書いたものであったので、なぜ私が招かれたのか不思議でならなかった。しかし後で次第に事情が分かってくると、私の参加は J. Aschoff 教授の推薦によるもので、私の日本語論文は当時同教授のものへ留学しておられた、北大の故本間慶蒼教授(研一教授のご尊父)が Aschoff 教授に訳して伝えられたことから生じたものようであった。

さてシンポジウムに出席してみると、講演する日本人は私一人で、他にアメリカに留学していた日本人動物学者が2名居て、医学出身の日本人は一人も居らず、まことに今昔の感が深い。なお当時

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、イチ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。

とにかく現在の日本時間生物学会の隆盛を見るにつけ、昔を思うと感慨無量である。今はただひたすら、この学会を創設された方々に深く敬意を表し、その益々の発展を心から祈るばかりである。

(1997年3月3日)



## 第4回日本時間生物学会学術大会の開催のご案内

柴田重信  
早稲田大・人間科学

日時：1997年11月7日(金)－11月8日(土)

場所：早稲田大学国際会議場(新宿区西早稲田)

一般講演(口演、ポスター)、シンポジウムを予定しています。  
ふるってご参加ください。

演題参加の案内は6月末の予定

演題締め切りは8月末の予定

問い合わせ先：早稲田大・人間科学・薬理学

柴田重信

Tel: 0429-47-6732

Fax: 0429-47-6806

e-mail: [shibata@human.waseda.ac.jp](mailto:shibata@human.waseda.ac.jp)

## 第3回日本時間生物学会学術大会 大会報告

田村康二

大会会長 山梨医科大学

1996年11月14日並びに15日の両日において甲府市総合市民会館を会場として大会を開催した。本会の主題として“時計遺伝子から時間治療まで”を選んでみたが幸い好天に恵まれ大会参加者はこれまでの会を上まわって総計 300 名の盛会であった。

学会の演題の中で最も重要な一般演題は全部で 83 題であり口演(口演5分、討論5分)とポスター提示とを併せて行ってもらった。その意図するところは全会員が全演題について知り、且つ討論に参加できる様に配慮した事であった。この目論見は当たって学术交流 が盛んに行われたのは主催者としては嬉しい事だった。一般演題は主題に選んだ如く時計遺伝子に代表される基礎科学的演題から時間治療に代表される臨床的講演まで幅広い分野の発表がなされた。

パネルディスカッションとして“時間生物学を如何に発展させるか?”が司会の千葉喜彦(山口大)並びに川崎晃一(九大)により行われた。第3回大会ともなれば本会の現状とそれを踏まえた将来への展望を語りあう事が大切と思ったからである。パネリストとしては中島秀明(岡山大)、本間研一(北大)、川村 浩(東亜大)、Smolensky, MH (Texas-Houston Univ., U.S.A.)の4人であった。各パネリストは基本的に以下の項目について論じ合った。1) 時間生物学の定義、2) 自身の研究の位置付け、3) 自身並びに関連分野での研究方法とその成果、4) 広く認知されている研究成果、研究発表の場、国内外の研究団体の情報、5) 今後の問題点等であった。時間生物学は新しい学問なので各

演者の学問的背景並びに研究に差異があることが明らかとなった。その事がむしろ今後の本学会の末広りの発展の展望を聴衆に与えて本パネルの意図は果たされたと思っている。

特別講演は Michael H. Smolensky, Director, Hermann Chronobiology Center, Professor of University of Texas-Houston, School of Public Health による「Medical Chronobiology and Chronotherapeutics in 1996 and beyond」と題する講演であった。時間生物学の特に臨床的研究の纏めは同じ方向性を求めている医師には極めて有用であった。彼の本学会への貢献に深謝している。

シンポジウムは“時間遺伝子から時間治療まで”と題して高橋清久(国立精神神経センター)と劔 邦男(山梨医大)の司会で行った。時計遺伝子の転写制御、石田直理雄(通産省生命工学工業技術研究所)、視交叉上核の分子学、篠原一之(横浜市大)、勤務交代とリズム、本橋豊(秋田大)、睡眠異常とリズム、石東嘉和(山梨医大)、高血圧の時間治療、井尻 裕(山梨医大)の発表があった。何れの発表も本学会の主題にふさわしい幅広く且つ奥深い内容であり時間生物学に関連する学際的研究を総括するシンポであった。

学会員は学会場で又懇親会を通して交流をし最後まで熱心に討議された。このようなお膳立てが出来ていささかなりとも本学会の発展に貢献出来たことを学会を主催した我々一同光榮に思っている。明年の早稲田大学での再会の折りにはまた一段と進んだ研究に出会える事を楽しみにしている。

## 藍色細菌の概日時計

岩崎秀雄, 石浦正寛, 近藤孝男  
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

1. はじめに
  2. 窒素固定型藍色細菌の生物時計～Huangらの研究を中心として
  3. 生物発光を利用した藍色細菌の実験系の開発
  4. プロモータートラップ法による遺伝子発現リズムの解析
  5. 藍色細菌の生物時計遺伝子群の同定
  6. 入力系の解析
  7. 出力系の解析
  8. 細胞分裂周期との関わり
  9. 概日時計の進化
  10. おわりに
- 付. 関連する総説の紹介

### 1. はじめに

概日リズムを生じる生物時計の分子機構を明らかにするためには、分子遺伝学的手法によって生物時計の構成因子を特定し、解析していくことが有効である。既にショウジョウバエやアカパンカビを用いた分子遺伝学的な研究により3つの時計遺伝子が同定され、多くの成果が得られている。しかし生物時計の分子機構を包括的に理解するためには、より能率のよい実験系を用いた系統的な時計遺伝子の解析が必要であろう。そのためには出来るだけ遺伝子操作が容易で単純な生物を用い、多くの個体(クローン)のリズムを同時に自動測定できる系を開発しなくてはならない。生物時計の存在が知られる最も単純な生物は原核生物の藍色細菌(シアノバクテリア)である。筆者らは藍色細菌にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、生物時計の運行を生物発光リズムとして自動測定することを可能にした。また寒天培地上の

多数のコロニーのリズム測定法を開発し、多数の生物時計変異体を得た。さらに時計変異体の野生型ゲノムライブラリーの導入による遺伝的相補により、3つの新規時計遺伝子をクローニングすることに成功し、現在その解析を進めている。この総説では筆者らによる分子遺伝学的解析を中心に、藍色細菌の概日リズム研究全般について出来るだけ網羅的に紹介する。

### 2. 窒素固定型藍色細菌の概日リズム～Huangらの研究を中心として

藍色細菌は原核生物の主要グループのひとつであり、細胞質中に光合成の明反応の場となるチラコイドをもち、酸素発生の光合成を行う。機能的にも構造的にも植物の葉緑体とよく対応することから、共生説においては葉緑体の系統的な起源と考えられている(65)。また、始原藍色細菌は35億年ほど前に地球上に現れ、大気中の酸素を発生させたと考えられる。従来、概日リズムは真核生物に特有の機能であり、原核生物には存在しないと考えられてきた。たとえば1970年代に藍色細菌でも概日リズムを見つけようとする試みがなされたが、成功を見なかった(91)。しかし十年ほど前から、いくつかの藍色細菌において概日リズムが報告されるようになった。

最初の報告は、単細胞性藍色細菌の窒素固定活性のリズムであった(25, 71)。窒素固定はいくつかの原核生物にのみ見られる機能であり、大気中の分子状窒素をアンモニアに還元するプロセスである。窒素固定反応を触媒する窒素固定酵素は酸素に高い感受性を示し、酸素により容易かつ不可逆的に破壊される。光合成に依存する藍色細菌の中にも窒素固定するも

のがあり、光合成によって生じる酸素から窒素固定系を守るためのいくつかの戦略を進化の過程で獲得してきた(5, 20)。たとえば糸状(多細胞性)藍色細菌の中には異型細胞(ヘテロシスト)と呼ばれる特殊な細胞を分化させ、窒素固定酵素活性をこの細胞でのみ発現させるものがある。異型細胞は光合成系 II を欠き、厚い細胞壁を発達させることで外部からの酸素侵入を防いでおり、光合成と窒素固定の空間的な分業を可能にしている。しかし単細胞性の窒素固定型藍色細菌ではこうした細胞分化は不可能であり、二つの代謝系の両立は大きな謎であった(20)。1980年代になると、単細胞性藍色細菌あるいは異型細胞を分化させずに窒素固定を行う糸状藍色細菌のいくつかの系統で、その窒素固定活性が LD サイクルの暗期にのみ高くなるとの報告が相次いだ(たとえば文献 76, 87, 88)。これらの発見によって窒素固定系の働く時期を時間的に光合成を行う時期から分離するとの見解が注目されるようになった。しかしこうした知見は明暗サイクル条件下で得られたものであり、概日リズムによる制御として考えられてはいなかった。

1986年になって二つのグループが、連続明条件下でも窒素固定型の単細胞性藍色細菌において窒素固定活性リズムが持続することを発表した。そのうち、Mitsui らは海産性の *Synechococcus* sp. Miami 43511 および 43522 という系統を用い、光合成による酸素発生、呼吸による酸素取り込み、窒素固定酵素活性、細胞分裂周期、炭水化物合成のリズムを示した(71)。しかし彼らも概日リズムによる制御を考慮せず、細胞分裂が約 24 時間ごとにおこることから、細胞分裂周期が光合成と窒素固定を時間的に分離する機構であると結論し、それ以降もこの観点に沿って研究を展開した。この結論については、後述するように細胞分裂周期と概日時計の関係という観点から再考の余地がある。

一方、台湾の Huang らは淡水性の *Synechococcus* sp. RF-1 という系統(30)を暗期にさらさずに連続明条件下で培養しても窒素固定リズムは検出されないが、LD 条件に移すと暗期にピークをもつ窒素固定活性リズムが出現し、さらに連続明条件下でもこのリズムが継続することを見出した(25)。彼らは、この現象が概日時計の光による同調とそれに続く恒常条件下でのリズムの継続であると正しく認識した。また、1989年には Sweeney と Borgese が海産の単細胞性藍色細菌 *Synechococcus* sp. WH7803(窒素固定は行わない)において温度補償性を伴う 24 時間周期の細胞分裂リズムが存在することを報告している(90)。

こうした知見は真核生物にのみ概日リズムが存在するとの当時の定説をくつがえすものであり、それゆえに藍色細菌の概日時計の存在を疑問視する見解も根強く残った(たとえば文献 47)。しかし Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 を用いて精力的に解析を行い、既に 20 篇におよぶ報告(10, 11, 13-16, 24-27, 29-39)で概日時計の存在を明らかにしてきた。*Synechococcus* sp. RF-1 の窒素固定活性リズムは 22~33°C の範囲で温度補償されており(38)、主に転写レベルで制御されていることが強く示唆されている(32, 34)。窒素固定活性自体にはカルシウムイオンが必要であるが(12)、mRNA 量のリズムには必要ないらしい(32)。また、この系統では少なくとも 8 種類のアミノ酸の取り込みにも概日リズムが見られる(10)。このリズムは窒素固定活性リズムとは逆の位相関係にあり、21~37°C の範囲で温度補償されている。さらに、0°C 6 時間の低温パルスによる大まかな位相反応曲線も報告されている(10)。複数の蛋白質の合成速度にも概日リズムがあり(29)、最近そのうちのひとつ(COP23 と命名)のアミノ酸配列およびコード遺伝子の塩基配列が明らかにされた(11)。これら *Synechococcus* sp. RF-1 のリズムは明暗サイクルだけでなく低温/

高温サイクルによっても位相のリセットを受ける(37, 29)。また、光合成活性の概日リズムを示唆する報告もある(82)。一方、海産の単細胞性藍色細菌 *Cyanothece* sp. ATCC 51142 では、窒素固定活性、光合成活性(炭水化物合成量)に加え、電子顕微鏡による観察から炭水化物を多く含む細胞内顆粒の形成にも概日リズムが見られることが報告されている(85)。さらに、Roenneberg らは別種の高産の単細胞性藍色細菌 *Trichodesmium thiebautii* で光合成活性(酸素放出)の概日リズムを報告している(81)。

このように藍色細菌の様々な系統で生物時計が存在することが確認されてきたが、これらの系統では遺伝子操作を援用することは出来ない。それどころか培養や寒天培地上でのコロニー形成といった基本的な取り扱い自体が著しく困難なものも含まれている。ゲノムサイズの小さい原核生物を用いて分子遺伝学的解析を行う利点は、システムが単純であるとともに、寒天培地上の多数のコロニーをスクリーニングすることで容易にミュータントを得られることにある。生物時計の分子遺伝学的な解析を行う場合には、膨大な数の個体(クローン)のリズムを再現性よく自動測定することが必要となる。しかし1993年に筆者らが発光レポーターを用いた系(後述)を開発するまでは、藍色細菌におけるリズムの測定はいずれも煩雑で、大量のサンプルを処理したり、安定した結果を得ることは非常に困難であった。それにも関わらず、1993年に Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計変異体の分離に成功している(39)。彼らはニトロソグアニジン処理した細胞のコロニー一つ一つを窒素を含まない液体培地に移植し、恒明条件下および明暗サイクル条件下での生育速度について野生型と比較した。生育速度の遅くなったクローンの窒素固定活性リズムおよびアミノ酸取り込みリズムを測定し、4つの突然変異体を報告した。うち二つ(M-17, M-32)は恒明条件下で窒素固定リズムが消失す

るが、アミノ酸の取り込みのリズムは正常である。残りの二つ(CR-1, CR-2)は窒素固定活性、アミノ酸取り込みともに無周期であった(39)。また、顕著な蛋白質合成リズムも見られない(Huang, 未発表;文献 35 に引用)。*Synechococcus* sp. RF-1 の無周期型突然変異体の分離は確かに先駆的な成果であった。しかし前述の理由(遺伝子操作が適用できない、リズム測定が煩雑)から、それに続く本格的な分子遺伝学的解析や緻密な生理学的解析を行うことは困難であり、突然変異体を十分に活かして生物時計の分子機構の核心に迫ることは今のところ期待できそうにない。また、彼らの変異体の分離法では生育速度を指標とする一次スクリーニングを行うため、生育に影響しないような時計の変異体を得ることは出来ない。

### 3. 生物発光を利用した藍色細菌の実験系

藍色細菌ではいくつかの系統で容易に高度な遺伝子操作(形質転換、遺伝子破壊など)を適用することができる(92)。そこで筆者らはこれらの藍色細菌を用いて生物時計の分子遺伝学的解析に適した実験系の構築を試みた。もし藍色細菌に普遍的に生物時計が見られるなら、窒素固定をしない系統においても何らかの生理活性に概日リズムを観察できる可能性がある。前述の非窒素固定型の *Synechococcus* sp. WH7803 で見られた細胞分裂リズム(90)はその唯一の例であったが、この系統でも遺伝子操作は適用できない。筆者らは単細胞性藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 という系統を用いて遺伝子操作により概日時計の運行をモニターする系を構築することにした。この系統は淡水産の桿菌で窒素固定を行わない。ゲノムサイズは2.7 Mb で大腸菌のそれよりも小さく、遺伝子の数は約3,000程度であろうと推定されている(44)。自然に外来のDNAを取り込む性質があり(naturally transformable)、さらに

大腸菌との接合を利用すればより高い効率での形質転換が可能である。また、高頻度で相同的遺伝子組替えがおこるため、染色体上の特定の座位への遺伝子ターゲティング、遺伝子の置換や破壊が容易で、すでに分子遺伝学的解析の材料として広く用いられている(92)。

概日リズムの突然変異体を網羅的に分離するためには、出来るだけ容易にリズムが測定出来ることが必須条件である。そのための最も理想的なリズムのマーカーとして生物発光が考えられた。高感度の光検出システムを用いれば、容易に発光を長時間連続的に自動測定することが可能だからである。しかも高い精度で再現性よく測定することが出来るため、緻密な生理学的解析も可能である。単細胞性渦鞭毛藻 *Gonyaulax* の生物発光リズムが概日時計研究に果たしてきた重要な貢献を見てもそのことは明らかだろう(43, 75)。折しも 90 年代初頭は、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いて、*in vivo*で特定の遺伝子発現をモニタリングしようとする試みが本格化しつつある時期であった。Wolk らは発光細菌のルシフェラーゼ遺伝子 *lux* をレポーターとして用いることで、窒素固定型糸状藍色細菌 *Anabaena* の窒素固定遺伝子の異型細胞特異的発現をモニターすることに成功した(19, 96, 97)。一方、Kay らは、概日時計に制御されるクロロフィル結合蛋白質遺伝子 *cab* のプロモーター領域の下流にホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luc* を連結することで、発光リズムを示すシロイヌナズナ *Arabidopsis* の形質転換体を作製した(67)。

筆者らは、発光細菌 *Vibrio harveyi* のルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* の翻訳領域の上流に、*Synechococcus* sp. PCC 7942 の *psbAI* 遺伝子プロモーター領域を連結した。*psbAI* 遺伝子は、光合成系 II(PSII)の中核蛋白質 D1 をコードし、藍色細菌内で非常に強く発現する(58)。作製したレポーター融合遺伝子は、相同的遺伝子組替えによって薬剤耐性マーカーとともに

藍色細菌染色体上の特定のターゲティング部位(neutral site 1)に挿入された(54)。neutral site は外来の DNA 断片を挿入しても挿入自体の影響が見られないゲノム上の座位である。*luxAB* 遺伝子にコードされるルシフェラーゼは還元型フラビンモノスクレオチド(FMNH<sub>2</sub>)、長鎖のアルデヒド(デカナール)および酸素を基質とする反応を触媒し、490 nm の生物発光を示す。脂溶性のデカナールは揮発性でもあり、気相を介して容易に細胞膜を透過する。したがって培養容器中にデカナールを充満させれば、単純な拡散によって常に一定レベルの基質を細胞内に供給することができる。作製した形質転換体(AMC149 と命名)を明暗サイクル(LD)条件下で培養したのち、連続明(LL)に移した。デカナール供給条件下で培養液の生物発光を光電子倍增管を用いて連続測定したところ、10 日にわたって約 24 時間周期の顕著な生物発光リズムを確認することが出来た(54)。発光強度は夜明けの位相(主観的昼のはじめ)に最小、黄昏の位相(主観的昼のおわり)に最大となる。このリズムは 4 時間の暗パルス投与により、時期特異的な位相変位をきたす。また、25°C、30°C、36°Cの各温度条件下での測定結果から、発光リズムの周期の温度補償性も確認された(54)。

AMC149 のリズムは本当に *psbAI* 遺伝子の発現リズムを反映しているのだろうか。たとえばルシフェラーゼの基質となる藍色細菌細胞内の酸素や還元型 FMN の量が光合成リズムに伴って概日変動している可能性も考えられよう。しかし *psbAI* 遺伝子の mRNA 量(54, 59)、*luxAB* 遺伝子の mRNA 量、ルシフェラーゼ蛋白質量は全て発光リズムと同様の概日リズムを示した(59)。このことから AMC149 の発光リズムは第一義的に *psbAI* の発現リズムを正確に反映するものと結論できた。この発光レポーターを利用したリズムモニタリング法は *Synechococcus* sp. PCC 7942 だけでなく、他

の形質転換の可能な藍色細菌にも適用することが出来る。すでに筆者らは球状の *Synechocystis* sp. PCC 6803 (2) や、糸状で窒素固定型の *Anabaena* sp. PCC 7120 において成功している。なお、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は昨年ゲノムの全塩基配列が発表された系統である(45)。

続いて筆者らは、多数のクローンの時計表現型をスクリーニングするために、寒天培地上の各コロニーの発光リズムを同時測定できる系を構築した。AMC149 は低ノイズの冷却 CCD カメラで測定可能な発光強度をもつ。そこでデカナールの投与法を改良したうえで、高感度の冷却 CCD カメラによって寒天培地上の各コロニーからの生物発光リズムを測定することに成功した。コロニーの発光リズムの周期は液体培養のそれと同じであり、持続性や再現性はむしろ優れていた(50)。続いて冷却 CCD カメラ、試料交換装置、制御コンピューターからなる多プレート生物発光測定装置を作製した。試料交換制御、検出器の制御、データの取り込みと解析のためのソフトウェアは独自に開発した。これにより 12 枚のシャーレを順次自動的に連続撮影することが出来る。1 枚のシャーレあたり 1,000 個程度のコロニーを解析できるため、同時に 12,000 におよぶコロニーの概日リズムの自動測定が可能となった(55)。

#### 4. プロモータートラップ法による遺伝子発現リズムの解析

筆者らが構築した系は *psbAI* 遺伝子の発現リズムを生物発光リズムとしてとらえるものであった。では、藍色細菌ではどの程度の遺伝子の発現が概日時計によって制御されているのだろうか。多くの真核生物では、80 年代後半から生物時計に制御される遺伝子が相次いで報告されている(たとえば文献 4, 6, 63, 77, 95)。前述の窒素固定型の *Synechococcus* sp. RF-1 でも同調後 LL 条件下でいくつかの遺伝子の

mRNA 量に概日リズムが見られる。窒素固定酵素の二つのサブユニットの一つをコードする *nifK* は主観的夜に発現する(32)。これは夜間特異的な窒素固定酵素活性をよく説明する。また Chow と Tabita は、もう一つの窒素固定酵素サブユニットをコードする *nifH* と炭酸固定酵素 RuBisCO をコードする *rbcSL* オペロンが LD 条件下ではそれぞれ暗期、明期特異的に発現するのに対し、LL 条件下ではともに主観的夜のはじめに発現のピークがあると報告している(16)。ただし、この報告の LL での結果には再現性に問題があるのではないと思われる。また、最近 Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 の機能未知の膜結合蛋白質をコードする遺伝子 *cop23* の発現リズムを報告したが(11)、その位相関係は *nifK* mRNA のリズムと異なり、*Synechococcus* sp. PCC 7942 の *psbAI* 遺伝子のもと同じであった。しかし特定の生物で生物時計による遺伝子発現の制御がどの程度一般的なものであるのかを調べることは従来まったく不可能なことであった。筆者らは、藍色細菌の高い相同組替え率、ゲノムサイズの小ささ、さらに前述の多プレート生物発光測定装置による発光パターンのスクリーニングを利用して、いわゆるプロモータートラップによって概日時計に制御される遺伝子群の包括的解析を試みた。

まず *Synechococcus* sp. PCC 7942 のゲノム DNA のランダムな断片をルシフェラーゼ遺伝子翻訳領域の上流に連結した融合遺伝子ライブラリーを作製し、藍色細菌のゲノムに挿入した。形質転換体の多くは発光を示さないが、プロモーター領域を含む断片を挿入されたクローンはその活性強度に応じて生物発光を示す。冷却 CCD カメラシステムを用いてこのような発光クローンをまず約 800 コロニー分離し、その発光パターンを調べてみると、驚いたことにそのすべてに概日リズムが見られた(62)。*Synechococcus* sp. PCC 7942 では予想外に多

くの遺伝子が生物時計に制御されていることとなる。発光リズムの位相関係を調べてみると、多数が AMC149 と同じ位相だった。*psbAI* と同じく光合成系 II の D1 蛋白質をコードするが光誘導性の異なる *psbAII* 遺伝子、グルタミン合成酵素をコードし光誘導性を欠く *glnA* 遺伝子、リズムを示さないであろうと期待して試した rRNA 遺伝子 *rrnA* のいずれもが、*psbAI* と同様のプロモーター活性を持っていることも明らかになった(62)。しかし 10-20%のクローンは AMC149 とは異なる位相関係の発光リズムを示した。たとえば AMC287 と命名したクローンは AMC149 とはちょうど逆位相のリズムを示す。このクローンでは、レポーター遺伝子の上流に、プリン合成系の遺伝子 *purF* のプロモーター領域が挿入されていた(61, 62)。*purF* 遺伝子の mRNA 量が概日リズムを示し、*psbAI* 遺伝子 mRNA のそれと逆位相関係にあることも確認された(61)。*purF* 遺伝子のすぐ上流には同じくプリン合成系の別の酵素をコードする *purL* 遺伝子が位置している。この二つの遺伝子は多くのほかの細菌ではオペロンを形成し共転写される。しかし *Synechococcus* sp. PCC 7942 では別個のプロモーターによって制御され、*purL* は(*purF* とは異なり)*psbAI* と同じ位相の発現リズムを示す(61)。最近、筆者らは *Synechocystis* sp. PCC 6803 でも同様のプロモータートラップを用いて位相関係の異なる複数の遺伝子群を同定した(青木ら, 1995 年植物学会年会)。

遺伝子のプロモーター活性に概日リズムが見られても、必ずしもその mRNA 量、コード蛋白質量や活性のリズムに反映されるとは限らない。概日時計以外によるなんらかの制御、それぞれの mRNA の安定性や転写後修飾、蛋白質の合成速度、安定性や修飾などが考えられるからだ。実際、前述のように rRNA をコードする *rrnA* 遺伝子のプロモーター活性には顕著な概日リズムが見られるが(62)、mRNA 量はサーカ

ディアン時間を通じてそれほど変化しない(23)。*Synechococcus* sp. PCC 7942 では概日時計が大多数の遺伝子のプロモーターを制御する。その中には細胞内での産物の振動に直接反映されるものもあろうし、一方では機能に応じて細胞内での産物レベルを一定に保つ遺伝子群もあるのだろう。

藍色細菌以外ではプロモータートラップをもちいた詳細な生物時計制御遺伝子群の探索は行われていない。最近 Kay らはホタルルシフェラーゼ遺伝子を CMV(カリフラワー・モザイクウイルス)35S プロモーターに連結して形質転換した *Arabidopsis* の生物発光に弱い概日リズムが見られる、と報告した(9)。また、緑藻 *Chlamydomonas* においても光合成系の遺伝子だけでなく、チトクローム *c* やチューブリンをコードする遺伝子の発現までが概日時計に支配されていることも明らかになった(41; Jacobshagen および Johnson, 私信)。したがって真核生物でも概日時計による転写制御が予想以上に一般的な可能性もある。

## 5. 藍色細菌の生物時計遺伝子群の同定と解析

リズムを駆動する概日時計は入力系を通じて環境刺激によるリセットを受け、環境変動と同調した細胞内の生理学的振動を確保し、出力系に時刻情報を伝えると考えられる。前述した藍色細菌の多くの遺伝子発現リズムは、概日時計からの出力を反映するものであろう。筆者らの最大の目的は概日時計の構成因子を同定し、その解析を通じてリズム発生の分子機構を明らかにすることにある。そこで、まず生物時計の変異体を得るため、AMC149 を変異源 EMS (ethyl methanesulfonate)で処理し、約 500,000 クローン(コロニー)の細胞を多プレート生物発光測定装置を用いてスクリーニングした。その結果今までに約 100 クローンにのぼる発光リズム変異体を分離することに成功している(55;

近藤ら, 未発表)。これらの変異は 16 時間周期から 60 時間におよぶ様々な周期の変異, 無周周期型, 低振幅型, 位相変化型, 波形の歪みなどあらゆるタイプの時計異常表現型を含み, 従来ほかの生物で得られていた時計の変異体に比べて遥かに多様であった。またこれらの変異形質は極めて安定しており, また生育も野生型と殆ど変わらない。

続いて, 筆者らは遺伝子相補に基づく周期突然変異の原因遺伝子のクローニングを試みた。このため新たに作製したターゲティング用ベクターとランダムな野生型藍色細菌のゲノム DNA 断片を用いてライブラリーを構築し, 複数の時計突然変異体を形質転換した。この際野生型の遺伝子断片は neutral site II と呼ばれる特定の領域に部位特異的に挿入され, 本来の遺伝子座は破壊されない。各突然変異体に関して約 15,000 クローンライブラリー挿入細胞をスクリーニングしたところ, 野生型と同様の発光リズムを示すクローンが複数分離された。そして最終的に相異なる 4 つの長周周期変異体 (*p30*, *p38*, *p48*, *LP60*; 文献 55) の各相補クローンから, 挿入されたそれぞれの遺伝子断片をプラスミドレスキュー法によって大腸菌に回収することに成功した。これらの各 DNA 断片は, 多様な表現型を示す複数の生物時計変異体を相補することが出来る。そこでサザンブロット解析や制限地図の作製を行ったところ, これら 4 つの断片が藍色細菌ゲノム上の同一の遺伝子座位に由来することが明らかとなった。さらに, 今まで得られている生物時計変異体からランダムに 50 クローン選んでこの領域 (*p48* 領域) を含むゲノム断片を遺伝子移入したところ, 殆どすべてが相補されることがわかった。続いて欠失クローンを用いた相補活性領域の限定と周辺領域の塩基配列決定を並行して行った結果, 生物時計の発現に大きく影響することが推察される領域にはオペロンを構成すると思われる 3 つの隣接したオープンリーディング・フレー

ム (ORF) *D*, *E*, *F* (仮称) が見つかった。実際, 今までに 40 クローンにのぼる生物時計変異体のマッピングを試みたが, そのすべてがその 3 つの ORF 上に落ちていた。とりわけ *F* 遺伝子上には短周周期型, 長周周期型, 無周周期型などあらゆる変化をもたらす生物時計変異がマッピングされた。また *F* 遺伝子を破壊した株やこれらの遺伝子を過剰発現させた株では概日リズムが消失した (Ishiura, Aoki, Kutsuna, Andersson, Iwasaki et al., 投稿準備中)。したがって, 得られた 3 つの遺伝子が生物時計の発現に密接に関与していることは明らかである。これらの遺伝子は相異なる蛋白質をコードし, そのアミノ酸配列中に既知の機能蛋白質との相同性は見出せない。ショウジョウバエ, アカパンカビの時計遺伝子産物 (PER, TIM, FRQ) との類似性もまったくない。

*F* 遺伝子上にマッピングされた複数の無周周期型突然変異体は, LD サイクルによっても, また高温・低温サイクルによっても概日リズムの発現が見られない。したがって *F* 遺伝子は入力系因子ではなく時計本体の構成因子であろう。また, プロモータートラップ法を無周周期型変異体に適用し, 広範な遺伝子発現リズムに対する影響を調べてみた。野生型ではすべての発光クローンが概日リズムを示すのに対して無周周期型変異体をもとにした発光クローンは一切リズムを示さなかった (近藤ら, 未発表)。この結果は *F* 遺伝子が出力系の因子ではないことを強く示すものといえる。

新たにクローニングした時計遺伝子群は新規のものであるため, コード蛋白質のアミノ酸配列からはその作用機構を推定することが出来ない。しかし, オペロンを構成することからなんらかの形で協調的に機能している可能性が高い。筆者らは酵母の two-hybrid 系と *in vitro* の系で最近これらの遺伝子の翻訳産物同士が様々な組み合わせで相互作用することを見出した (岩崎ら, 1996 年時間生物学会年会)。また,

最近 *D* 遺伝子上の時計変異のサブレッサーを *F* 遺伝子上に同定することにも成功した。藍色細菌内でも時計蛋白質が相互作用して概日リズムの発現に関与しているのではないかと考えられる。

いっぽう、ルシフェラーゼ・レポーターを用いて時計オペロンのプロモーター活性を測定したところ、顕著な概日リズムを示した(匿名者, 1997 年植物生理学会年会)。このリズムは時計遺伝子上にマッピングされた時計の変異によって影響を受ける。すなわち、短周期型、長周期型、無周期型の変異株では時計遺伝子のプロモーター活性はそれぞれ同様の周期の変化、リズムの消失を示す。この事実は、生物時計遺伝子にコードされる生物時計蛋白質がなんらかの形で自らの遺伝子の発現をコントロールしていることを意味している。これが概日リズムの発生に本質的なのか、単なる結果に過ぎないのかはまだ不明である。もし本質的だとすれば、ショウジョウバエの *per*(28, 98, 99) と *tim*(86, 99), アカパンカビの *frq*(3) の作用機構として提案されてきた時計蛋白質のネガティブ・フィードバック・モデルとよく符合する。このモデルでは、時計蛋白質が間接的もしくは直接的に自らをコードする遺伝子の発現を抑制することで時計蛋白質量のリズムを説明する。ショウジョウバエ(28, 99), アカパンカビ(17)の系では、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数時間のタイムラグ(位相のずれ)が見られる。これは分子レベルの概日振動の安定化に寄与するとされ、一義的には時計蛋白質の核移行の制御によって確保されるとの仮説が提案されている(28, 83, 86, 99)。これらショウジョウバエ、アカパンカビの時計蛋白質分子の振動モデルは藍色細菌の生物時計遺伝子群の機能解析をするうえで作業仮説としては有効であろう。ただし核をもたない藍色細菌にそのまま適用できないこともまた明らかである。なお、ヤマユガの脳の時

計細胞では PER, TIM 相同蛋白質が核移行せずに細胞質内に局在すると最近報告されており(84), 時計遺伝子の作用機構が生物種によってどの程度共通しているのに興味深い。その意味でも藍色細菌の生物時計遺伝子の機能解析は重要であると言えよう。

## 6. 入力系の解析

藍色細菌の概日時計の位相合わせをもたらす要因として、光情報以外に次のようなものが報告されている。*Synechococcus* RF-1 では低温刺激によって位相変位がおこり(10), 温度サイクル(24, 29, 37)や DCMU(光合成系阻害剤)の添加除去サイクル(32)によって概日リズム発現が誘導される。AMC149 においても同様に温度サイクルによる概日リズムの同調(近藤ら, 未発表)が観察されている。また、最近筆者らの研究室の井上, 岡本は暗パルス, 温度パルスによる AMC149 の発光リズムの位相応答を詳しく調べ、この藍色細菌の生物時計の位相応答が多く真核生物のそれと同じであることを示した(井上ら, 1997 年植物生理学会年会)。また, Sherman らは定常状態の培養液を新たな培地で希釈することで単細胞性藍色細菌 *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 の窒素固定活性と炭水化物量の概日変動が誘導されると報じている(85)。したがって光受容体, 温度センサーなど複数の外界刺激応答分子が位相合わせに関与していると思われる。

藍色細菌の概日時計の位相合わせに必要な光の波長特性については、今のところ *Synechococcus* RF-1 に関する Chen らによる報告(13)があるのみである。この系統では白色光で培養したのち 12 時間の暗期を与えて再び連続白色光照射下に戻すことで窒素固定活性リズムが発現する。しかし白色光の代わりに赤色光(680 nm)条件下で培養したのち暗処理をし、再び連続赤色光下に移しても窒素固定リズムが誘導され継続する。それに対し、白

色光で培養したのち暗期の代わりに赤色光を与えてもリズムは誘導されない。680 nm とはクロロフィル *a* の吸収波長であり、先述の DCMU 処理サイクルによるリズム誘導の観察も加味して、Chen らは光合成系の暗パルスによる遮断によってリズムが誘導されると考えている。高等植物では赤色光と近赤外光による可逆的光応答を担うフィトクロームが概日時計の光入力系に関与しており(64)、時計を同調させるための暗処理期間中に近赤外光パルスを与えるとしばしばリズムの位相変位がもたらされる(たとえば文献 77)。そこで Chen らは *Synechococcus* RF-1 を赤色光で培養したのち暗条件に移し、その間のさまざまな時間帯に 30 分間の近赤外光(730 nm)を与えてみたが、その後のリズムの位相の乱れは一切おこらなかった。この結果から、藍色細菌ではフィトクローム類似物質は時計の位相応答に関与していないと推論している(13)。

*Synechococcus* sp. PCC 7942 ではまだ時計入力系の変異体と結論できるものは得られていないが、*Synechococcus* RF-1 の前述の無周期型変異体 CR-1、CR-2(39)に関しては興味深い観察がある。CR-2 は明暗サイクル、温度サイクルのいずれによっても概日リズムの同調が見られないのに対し、CR-1 は明暗サイクルには同調しないが温度サイクルにより窒素固定リズムおよび蛋白質合成リズムが見られるというのだ(Huang, 私信)。このことから、Huang は CR-1、CR-2 はそれぞれ光入力系、時計本体の変異体ではないかと考えている。

光応答伝達系一般に関して、高等植物の豊富な解析に比べて藍色細菌での分子生物学的研究はかなり遅れている。しかし最近 Grossman らは *Fremyella diplosiphon* という種を用いて、藍色細菌としては初めて光受容体をコードする遺伝子のクローニングに成功した(46)。この種は赤色光と緑色光の比率に応じて、集光色素の構成成分を可逆的に変化させ

ることで高い光吸収効率を確保している。分子遺伝学的手法を用いて明らかにされた光受容体遺伝子 *RcaE* のコード蛋白質は高等植物のフィトクロームおよびエチレン受容体と相同な領域を持っていた。全ゲノム塩基配列が明らかになった *Synechocystis* sp. PCC 6803(45)もフィトクローム類似遺伝子を持っている。また、植物の青色光受容体遺伝子と類似する配列も見つかった。したがってこれらの藍色細菌の光受容体遺伝子候補を利用することで分子遺伝学的に藍色細菌の生物時計の光入力系を明らかにしていくことが期待できよう。なお *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、一日に約 5 分間の光パルスさえ与えれば暗条件下で従属栄養的に生育させることが可能である(1)。AMC149 と同様にルシフェラーゼ・レポーターを導入した *Synechocystis* の形質転換体は連続明条件下で発光リズムを示すが(2)、連続暗条件下でも発光リズムをとらえることが出来た(Aoki, Kondo, Wada and Ishiura, *J. Bacteriol.* 投稿中)。この特性は時計の光応答性の詳細な解析に有利である。

筆者らが主として用いている *Synechococcus* sp. PCC 7942 では Golden らが光応答性遺伝子群の研究を精力的におこなっており、少なくとも赤色光、青色光特異的な効果が報告されている(22, 58, 94)。したがって *Synechococcus* sp. PCC 7942 においても複数の光波長特異的な受容体が存在するのは明らかである。*Synechococcus* sp. PCC 7942 における時計の光入力系の解析はまだ始まったばかりであるが、上記の知見と筆者らの開発した系を用いることでその分子機構を明らかにしていくことが可能であろう。

## 7. 出力系の解析

*Synechococcus* sp. PCC 7942 では、前述のように大多数の遺伝子のプロモーターが概日時計に制御されている。それらの多くのプロモ

ーター領域およびそれを制御する転写因子の解析をすることにより、広範な遺伝子発現リズムの包括的な理解が期待できよう。筆者らは既出力系に関わる因子の一つとして RNA ポリメラーゼのシグマ因子のメンバーを特定している(93)。これは AMC149 のゲノムに薬剤耐性マーカーをランダムに挿入してスクリーニングすることで分離された低振幅型突然変異体 M16 (周期は 24 時間で野生型と同じ)の原因遺伝子として同定された。この遺伝子 *rpoD2* の破壊株では *psbAI* の発現リズムは低振幅型になるが、*purF* の発現リズムは野生型と変わらない。また、前述のプロモータートラップの際に得られた、AMC149 と同じ位相の発光リズムを示す 3 種類のレポーター株それぞれの *rpoD2* を破壊したところ、そのうちの一つの発光リズムの振幅が落ち、残りの二つに関しては変化が見られなかった。したがって、RpoD2 蛋白質は生物時計の本体ではなく出力系の構成要素であり、*psbAI* と同じ位相で概日発現する遺伝子の一群を制御するものと考えられる。

*Synechococcus* RF-1 では転写レベルの包括的な解析はなされていないが、多くのポリペプチドの合成速度に概日変動が見られることがわかっている(29)。速度が最大となる位相はポリペプチドによって異なり、概ね 4 つの位相に分かれた。前述のように、*Synechococcus* sp. PCC 7942 では大多数の遺伝子のプロモーターが概日時計に制御されていることから、*Synechococcus* RF-1 でもそうした広範な転写レベルの制御が行われている可能性がある。真核生物の場合と異なり、原核生物では転写と翻訳の場が核膜によって分断されておらず、むしろカップリングしている。したがって、転写レベルの制御はより直接的に蛋白質合成に影響するはずである。このことを考えれば、*Synechococcus* RF-1 で見られた多数の蛋白質の合成速度リズムは、一義的には転写レベルの制御に由来しているかも知れない。

個々の遺伝子発現リズムと、光合成や後述する細胞分裂周期などの生理過程に見られるリズムとの間を埋める作業は今後の大きな課題である。

## 8. 細胞分裂周期との関わり

細胞分裂周期は概日リズムとならぶ代表的な生体振動であり、その関連性が注目され、多くの解析がなされてきた(18)。その過程で概日時計は細胞分裂周期とは独立であり、むしろしばしば細胞分裂周期を制御することが明らかになってきた。その一方で、細胞膜や核などの細胞構造を重視した概日時計のモデルがしばしば提案されている(たとえば文献 78)。また、先述のように近年ショウジョウバエ、アカパンカビで提案された時計遺伝子のフィードバック・モデルでも時計蛋白質の核移行が重要なステップとして認識され、必然的に核構造に依存する。とすれば細胞構造を大幅に変更し、多くの生体内物質濃度に影響する細胞分裂過程と概日時計機構との関連性は今なお重要な問題である。

従来、細胞分裂周期が概日周期よりも短い細胞では概日リズムは発現しないという見方が支配的であった(80)。たとえば *Tetrahymena* やミドリムシ *Euglena* では分裂周期が一日よりも短い細胞では概日リズムが観察されなかった(18)。藍色細菌でも、概日リズムが観察されてきたのは 24 時間周期で分裂する細胞(71)、倍加時間(doubling time; 以下 DT)の遅い細胞(90)、定常状態ないし分裂停止状態の細胞(29, 72)においてのみであった。前述の筆者らの AMC149 のリズムも、もっぱら指数増殖期を過ぎ定常状態に近くなった状態での観察である。しかし *Synechococcus* sp. PCC 7942 は指数増殖期には DT が概日周期よりも短くなる。そこで筆者らは、寒天培地上およびバッチ液体培養中で DT 約 10 時間で指数増殖を続ける AMC149 の発光パターンを高感度の光電子

倍增管を用いて測定した。その結果発光は指數的增加とともに顕著な概日振動を示した(53)。さらに DT5-6 時間または 10 時間での増殖を保ちつつ細胞密度を一定に保つ連続培養でも、光合成系の遺伝子 *psbA1*, *psbA11* の mRNA 量の概日変動を確認した。また、Johnson らも DT 約 10 時間で増殖する AMC149 の連続培養を用い、同様に生物発光の概日リズムを示した(74)。

これらの結果は藍色細菌では概日振動が細胞分裂に影響を受けないことを示している。しかしこれは概日時計と細胞分裂が相互に独立であることを意味するものではない。実際、Johnson らは DT 約 10 時間で指数増殖する *Synechococcus* sp. PCC 7942 の連続培養を用い、概日周期の特定の位相では細胞分裂が起こらないことを明らかにした(74)。では DNA の複製についてはどうだろうか。真性細菌では一般的に *dnaN* 遺伝子にコードされる DNA ポリメラーゼ III が DNA 複製に関与しており、染色体複製開始点は *dnaN* 遺伝子座の近傍に存在する。Liu と Tsinoremas は *Synechococcus* sp. PCC 7942 の染色体複製開始点と思われる遺伝子領域を *dnaN* 遺伝子座のすぐ上流に特定し、ルシフェラーゼ・レポーターを用いて *dnaN* 遺伝子の発現が概日時計に制御されることを見出した(60)。このことから、彼らは DNA 複製が概日時計に制御される可能性を指摘していた。原核生物にはゲノムを細胞あたり多コピー持つものが少なくない。*Synechococcus* sp. PCC 7942 の場合も細胞あたり複数コピーのゲノムを保持している(7)。Johnson らは前述の連続培養を用いて細胞あたりのゲノム数の変動、細胞サイズの変動を測定し、前述の細胞分裂のパターンを加味して、藍色細菌ではサーカディアン時間を通じて DNA 複製は一定の速度で持続的に行われることを見出した(74)。真核生物とは異なり、原核生物では細胞分裂周期と染色体の複製が必ずしも完全にカップリング

しているわけではなく、脱共役しているものも多い(7)。

このように、概日周期よりも短い倍加時間で増殖する細胞でも概日時計が遺伝子発現、細胞分裂を制御することが明らかとなったことは、概日時計についての従来の基本的理解に変更を促すものとして重要である。一方筆者や Johnson らとは異なり、Mitsui らは前述の 1986 年の報告(71)以来 *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 を用いた一連の研究(57, 69-73, 89)で一貫して藍色細菌の様々な生理活性リズムを細胞分裂周期に依存する制御と見なして研究を進めた。前述のように彼らは明暗サイクル同調後、連続明条件下でこの藍色細菌の光合成活性(酸素放出)、窒素固定活性、炭水化物量、細胞分裂が連続明条件下で約 24 時間周期で変動することを見出した(71)。さらに彼らはグリコゲン合成量(57, 69)や集光色素フィコシアニン合成(89)、NADPH 生成およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素活性(Ikemoto and Mitsui, 未発表;文献 73 に引用)、不飽和脂肪酸合成(Kabata and Mitsui, 未発表;文献 73 に引用)などにも約 24 時間周期のリズムを見出している。1993 年、彼らは *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 の細胞分裂、窒素固定活性、酸素放出のリズムを従来の 30°C ではなく 24°C, 36°C で測定した結果を報告した。それによれば、連続明条件下 30°C ではこうした生理活性リズムの周期は約 20-24 時間だが、24°C では 25-30 時間に、36°C では 6-10 時間となり、いずれも培養の倍加時間と同じであった(73)。この結果から、彼らは光合成、窒素固定のリズムは明らかに細胞分裂周期に依存するものであると結論した。しかし、その後彼らは分裂が停止した *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 の培養中にも窒素固定活性、光合成活性の日周変動を見出し(72)、彼らは細胞分裂周期と第二の内因性的リズム機構の双方が関与していると推論した。しかし、彼らの観察し

たリズムがすべて概日時計に制御されているものであったと考えることも出来よう。とすれば1993年の観察は、観測温度条件下での(概日時計の基本特性である)周期の温度補償性の破綻を意味する。24°Cと30°Cにおける周期の差異は実験誤差範囲とも思われることから、*Synechococcus* sp. Miami BG 043511では36°Cはもはや温度補償性の有効範囲外なのかも知れない。

## 9. 概日時計の進化

藍色細菌から高等動物に至るまで、概日リズムの生理的特性は驚くほど共通している。その一方で、今までにショウジョウバエ、アカパンカビ、そして藍色細菌で明らかにされた時計遺伝子がコードするアミノ酸配列には明確な類似性は認められない。原核生物の時計と真核生物の時計は、もともと共通の時計のプロトタイプから派生してきたものなのだろうか、あるいは進化の過程で独立に獲得されたものなのだろうか。前述のように、ショウジョウバエとアカパンカビの時計遺伝子の作用機構モデルは核を前提としていた。このモデルが真核生物の時計に一般的かつ基本的であれば、核をもたない原核生物では真核生物とは異なる時計を持っているなければならない。

いっぽう、共生説では藍色細菌は植物葉緑体の系統的祖先と考えられている。もしそうであれば、植物の概日時計には藍色細菌の時計と共通の機構、構成要素が保持されている可能性もあろう。緑藻 *Chlamydomonas* では、葉緑体ゲノムにコードされる多くの遺伝子の発現が概日制御されることも最近わかってきた(40)。この点で、シロイヌナズナ *Arabidopsis* を用いた Kay らによる生物時計の分子遺伝学的解析は非常に興味深い。彼らはクロロフィル結合蛋白質をコードする *cab* 遺伝子のプロモーター領域の下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を連結して *Arabidopsis* を形質転換し、発光リズム

を示すクローンを作製した(67)。続いてその発光リズムを指標として EMS 処理した実生をスクリーニングし、既に10を超える様々な時計の突然変異体を分離している(66; Kayら、私信)。そのうち *toc1* 突然変異は *cab* 遺伝子の発現リズム、葉の就眠運動リズムがともに短周期(21時間)になる(66, 68)。*toc1* 遺伝子についてはマッピングと染色体歩行による同定作業がかなり進んでおり(Strayer and Kay, 私信)、その他の時計変異(66)のマッピングも現在行われつつある。したがって近い将来、植物の時計遺伝子と藍色細菌の時計遺伝子の比較によって新たな知見が得られるかも知れない。

また、筆者らが同定した *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生物時計遺伝子群の、他の生物種における類似遺伝子の探索も現在行っている。既に明らかになっている藍色細菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノム配列の中には複数コピーの類似遺伝子が存在し、翻訳アミノ酸配列の相同性は極めて高い。また、最近筆者らは糸状多細胞性で窒素固定型の *Anabaena* sp. PCC 7120、好熱性藍色細菌 *Synechococcus vulcanus* からも非常に保存性の高い類似遺伝子をクローニングし、解析を進めている(宇津巻ら、1997年植物生理学会年会)。筆者らの同定した時計遺伝子は少なくとも藍色細菌では広く一般的に存在すると思われる。その他の原核生物、真核生物においても類似遺伝子が存在するかどうか興味深い。

## 10. おわりに

筆者らは藍色細菌を用いて新たな実験系を開発し、従来の時計研究の障害の多くを取り除くことが出来た。すでに3つの時計遺伝子群をクローニングし、その解析を進めている。また、筆者らの開発したリズムの測定系のメリット(安定性、高い時間分解能)を活かして新たな生理学的解析も開始しつつある。まだ前途は遠いが、藍色細菌を用いた解析は概日時計の分子

機構の包括的な解明のための最も有望なアプローチの一つである。

現在多くの生物で概日時計の分子遺伝学解析が精力的に行われている。しかしながら日本ではこの新しい流れはまだ十分に浸透しているとは言いがたい。また、植物や微生物を用いた時計の解析も欧米に比べて非常に少ないのが現状である。これは藍色細菌を用いた時計の解析の中間報告であるが、この機会に少しでも多くの方々が生物時計の分子遺伝学的解析、あるいは植物や微生物を用いた時計の解析に興味を持っていただければ幸いである。

#### 付. 関連する総説の紹介

藍色細菌の生物時計研究一般に関しては、最近筆者らが書いたもの(23)がもっとも充実しており、現段階での未発表データもいくつか載せている。この英文総説では必ずしも藍色細菌の生物時計研究のすべての報文を紹介したわけではない。本総説では現在までに出版された藍色細菌の生物時計の論文を一応網羅したつもりであり、いくつかの情報も新たに追加した。筆者らの不注意で万一抜けている論文があれば、是非御連絡いただきたい。筆者らの *Synechococcus* sp. PCC 7942 を用いた概日時計の分子遺伝学的解析については、もっとコンパクトにまとめたものもある(42, 45, 49)。*Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計研究については Huang と Grobbelaar による総説(文献 35)がある。

窒素固定型の単細胞性藍色細菌一般については最近出版された詳細な総説(5)を参照されたい。*Synechococcus* sp. PCC 7942 における光誘導性遺伝子群の解析については Golden による文献(22)がある。また、藍色細菌の分子生物学的研究一般に関しては Bryant 編(8)、培養や具体的な実験技術などに関しては Packer および Glazer 編(79)の総説をそれぞれあげておく。

藍色細菌の和文の総説としては以下の筆者らの手になるものがある。文献(51, 52)では筆者らの分子遺伝学的解析のアウトラインを簡潔に紹介した。また文献(56)では、主に筆者らが開発したルシフェラーゼ・レポーターを用いた遺伝子発現の測定系の技術的側面について解説した。

謝辞:ここに紹介した *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生物時計の解析は当研究室のプロジェクトであるが、Susan S. Golden(Texas A&M Univ.), Carl H. Johnson(Vanderbilt Univ.)両博士にも協力していただいている。本稿を書くにあたって、未発表のデータを引用させていただいた沓名伸介氏、青木撰之博士(現・名古屋大学人間情報学研究所)をはじめとする筆者らの研究室のメンバーに感謝する。また、*Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計の報文リストを作成するにあたり、Tan-Chi Huang 博士(中央研究院植物研究所, 台湾)に御協力頂いた。また、同博士には *Synechococcus* sp. RF-1 の無周期型変異体の表現型について未発表のデータを教えていただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

#### 引用文献

1. Anderson SL, and McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* 173, 2761-2767
2. Aoki S, Kondo T, and Ishiura M (1995) Circadian expression of the *dnaK* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 177, 5606-5611
3. Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, and Dunlap JC (1994) Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation

- of the clock gene *frequency*. *Science* 263, 1578-1584
4. Bell-Pedersen D, Shinohara ML, Loros JJ, and Dunlap JC (1996) Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night- to early morning-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13096-13101
  5. Bergman B, Gallon JR, Rai AN, and Stal LJ (1997) N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 139-185
  6. Beter J and Kloppstech K (1994) Circadian rhythmicity in the expression of genes in higher plants. *Mol. Biol.* 13, 203-219
  7. Binder BJ and Chisholm SW (1990) Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *J. Bacteriol.* 172, 2313-2319
  8. Bryant DA ed. (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht)
  9. Carre I and Kay SA (1995) Multiple DNA-protein complexes at a circadian regulated promoter element. *Plant Cell* 7, 2039-2051
  10. Chen T-H, Chen T-L, Hung L-M, and Huang T-C (1991) Circadian rhythm in amino acid uptake by *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiol.* 97, 55-59
  11. Chen H-M, Chien C-Y, and Huang T-C (1996) Regulation and molecular structure of a circadian oscillating protein located in the cell membrane of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Planta* 199, 520-527
  12. Chen T-H, Huang T-C, and Chow T-J (1988) Calcium requirement in nitrogen fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. RF-1. *Planta* 173, 253-256
  13. Chen T-H, Pen S-Y, and Huang T-C (1993) Induction of nitrogen-fixing circadian rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1 by light signals. *Plant Sci.* 92, 179-183
  14. Chou H-M, Chow T-J, Tu J, Wang H-R, Chow H-C, and Huang T-C (1989) Rhythmic nitrogenase activity of *Synechococcus* sp. RF-1 established under various light-dark cycles. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 30, 291-296
  15. Chou H-M and Huang T-C (1991) Ultrastructure of the aerobic, nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria *Synechococcus* sp. RF-1. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 92. *Algol Studies* 64, 53-59
  16. Chow T-J and Tabita FR (1994) Reciprocal light-dark transcriptional control of *nif* and *rbc* expression and light-dependent posttranslational control of nitrogenase activity in *Synechococcus* sp. RF-1. *J. Bacteriol.* 176, 6281-6285
  17. Dunlap DC (1996) Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 30, 579-601
  18. Edmunds LN Jr (1988) *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks*. (Springer Verlag, NY)
  19. Elhai F and Walk CP (1991) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* 9, 3379-3388
  20. Gallon JR (1981) The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends Biochem. Sci.* 6, 19-23
  21. Gallon JR, Perry SM, Rajab TMA, Flayeh KAM, Yunes JS, and Chaplin AE (1988)

- Metabolic changes associated with the diurnal pattern of  $N_2$  fixation in *Gloeothece*. J. Gen. Microbiol. 134, 3079-3087
22. Golden SS (1995) Light-responsive gene expression in cyanobacteria. J. Bacteriol. 177, 1651-1654
  23. Golden SS, Ishiura M, Johnson CH, and Kondo T (1997) Cyanobacterial circadian rhythms. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 48, 327-354
  24. Grobbelaar N and Huang T-C (1992) Effect of oxygen and temperature on the induction of a circadian nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. J. Plant Physiol. 140, 391-394
  25. Grobbelaar N, Huang T-C, Lin H-Y, and Chow T-J (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. FEMS Microbiol. Let. 37, 173-177
  26. Grobbelaar N, Li W-T, and Huang T-C (1992) Relationship between the nitrogenase activity and dark respiration rate of *Synechococcus* sp. RF-1. FEMS Microbiol. Let. 83, 99-102
  27. Grobbelaar N, Lin H-Y, and Huang T-C (1987) Induction of a nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. Curr. Microbiol. 15, 29-33
  28. Hardin PE, Hall JC, and Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature 343, 536-540
  29. Huang T-C, Chen H-M, Pen S-Y, and Chen T-H (1994) Biological clock in the prokaryotic *Synechococcus* RF-1. Planta 193, 131-136
  30. Huang T-C and Chow T-J (1986) New type of  $N_2$ -fixing unicellular cyanobacterium (blue-green alga). FEMS Microbiol. Let. 36, 109-110
  31. Huang T-C and Chow T-J (1988) Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice field. J. Gen. Microbiol. 137, 3089-3097
  32. Huang T-C and Chow T-J (1990) Characterization of the rhythmic nitrogen-fixing activity of *Synechococcus* sp. RF-1 at the transcriptional level. Curr. Microbiol. 20, 23-26
  33. Huang T-C and Chow T-J (1991) Setting of the circadian  $N_2$ -fixing rhythm of the prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1 while its *nif* gene is repressed. Plant Physiol. 96, 324-326
  34. Huang T-C, Chow T-J, and Hwang I-S (1988) The cyclic synthesis of the nitrogenase of *Synechococcus* RF-1 and its control at the transcriptional level. FEMS Microbiol. Let. 50, 127-130
  35. Huang T-C and Grobbelaar N (1995) The circadian clock in the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Microbiol. 141, 535-540
  36. Huang T-C, Lay K-C, and Tong S-R (1991) Resetting the endogenous circadian  $N_2$ -fixing rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Bot. Bull. Acad. Sinica 32, 129-133
  37. Huang T-C and Pen S-Y (1994) Induction of a circadian rhythm in *Synechococcus* RF-1 while the cells are in a "suspended state". Planta 194, 436-438
  38. Huang T-C, Tu J, Chow T-J, and Chen T-H (1990) Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Plant Physiol. 92, 531-533

39. Huang T-C, Wang S-T, and Grobbelaar N (1993) Circadian rhythm mutants of the prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1. *Cur. Microbiol.* 27, 249-254
40. Hwang S, Kawazoe R, and Herrin DL (1996) Transcription of *tufA* and other chloroplast-encoded genes is controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 996-1000
41. Jacobshagen S and Johnson CH (1994) Circadian rhythm of gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: circadian cycling of mRNA abundances of *cab*, and possibly of  $\beta$ -tubulin and cytochrome *c*. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 142-152
42. Johnson CH, Golden SS, Ishiura M, and Kondo T (1996) Circadian clocks in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 21, 5-11
43. Johnson CH and Hastings JW (1986) The elusive mechanism of the circadian clock. *Am. Scientist.* 74, 29-36
44. Kaneko T, Matsubayashi T, Sugita M, and Sugiura M (1996) Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Mol. Biol.* 31, 193-201
45. Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, and Tabata S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
46. Kehoe D and Grossman AR (1996) Similarity of chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409-1412
47. Kippert F (1991) Essential clock proteins/circadian rhythms in prokaryotes -What is the evidence? *Bot. Acta* 104, 2-4
48. Kondo T (1996) Molecular Genetic Approaches to the circadian clock of cyanobacteria. In *Circadian Organization and Oscillatory Coupling*. ed. Honma, K. and Honma, S. (Hokkaido University Press, Sapporo)
49. Kondo, T., Golden, S.S., Johnson, C.H. and Ishiura, M. (1994) Circadian rhythms of cyanobacteria expressed from a luciferase reporter gene. In *Evolution of Circadian Clock*. ed. Hiroshige, T. and Honma, K. (Hokkaido University Press, Sapporo)
50. Kondo, T. and Ishiura, M. (1994) Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. *J. Bacteriol.* 176, 1881-1885
51. 近藤孝男, 石浦正寛 (1994) 「藍色細菌の概日性時計: 生物発光レポーターを利用した分子遺伝学」蛋白質核酸酵素 39, 2792-2802
52. 近藤孝男, 石浦正寛 (1995) 「バクテリアの生物時計: 時計遺伝子を目指して」バリエイティ 10(6), 37-40
53. Kondo T, Mori T, Lebedeva NV, Aoki S, Ishiura M, and Golden SS (1997) Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* 275, 224-227
54. Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Golden SS, and Johnson CH

- (1993) Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5672-5676
55. Kondo T, Tsinoremas NF, Golden SS, Johnson CH, Kutsuna S, and Ishiura M (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266, 1233-1236
56. 近藤孝男, 山口登, 石浦正寛 (1996) 「ルシフェラーゼ遺伝子による遺伝子発現のリアルタイムモニター」 *生物物理* 208, 289-292
57. Kumazawa S and Mitsui A (1992) Photosynthetic activities of a synchronously grown aerobic  $N_2$ -fixing unicellular cyanobacterium, *Synecho-coccus* sp. Miami BG 043511. *J. Gen. Microbiol.* 13, 149-153
58. Li R and Golden SS (1993) Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11678-11682
59. Liu Y, Golden SS, Kondo T, Ishiura M, and Johnson CH (1995) Bacterial luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2080-2086
60. Liu Y and Tsinoremas NF (1996) An unusual arrangement for the putative chromosome replication origin and circadian expression of *dnaN* in *Synecho-coccus* sp. strain PCC 7942. *Gene* 172, 105-109
61. Liu Y, Tsinoremas NF, Golden SS, Kondo T, and Johnson CH (1996) Circadian expression of genes involved in the purine biosynthetic pathway of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 20, 1071-1081
62. Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, Lebedeva NV, Golden SS, Ishiura M, and Kondo T (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.* 9, 1469-1478
63. Loros JJ, Denome SA, and Dunlap JC (1989) Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science*, 243, 385-388
64. Lumsden PJ (1991) Circadian rhythms and phytochrome. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 351-371
65. Margulis L (1993) *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. (Freeman & Company, NY), pp. 452
66. Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua N-H, and Kay SA (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267, 1161-1163
67. Millar AJ, Short SR, Chua N-H, and Kay SA (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4, 1075-1087
68. Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua N-H, and Kay SA (1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267, 1163-1166
69. Mitsui A, Cao S, Takahashi A, and Arai T (1987) Growth synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Synecho-coccus* sp. strain Miami BG 043511 under continuous illumination. *Physiol. Plant.* 69, 1-8
70. Mitsui A and Kumazawa S (1988) Nitrogen fixation by synchronously growing

- unicellular aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 484-490
71. Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto H, Cao S, and Arai T (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323, 720-722
  72. Mitsui A and Suda S (1995) Alternative and cyclic appearance of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> photoproduction activities under non-growing conditions in an aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Curr. Microbiol.* 30, 1-6
  73. Mitsui A Suda S, and Hanagata N (1993) Cell cycle events at different temperatures in aerobic nitrogen-fixing marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. *J. Mar. Biotechnol.* 1, 89-91
  74. Mori T, Binder B, and Johnson CH (1996) Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10183-18186
  75. Morse DS, Fritz L, and Hastings JW (1990) What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *Trends Biochem. Sci.* 15, 262-265
  76. Mullineaux PM, Gallon JR, and Chaplin AE (1981) Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiol. Let.* 10, 245-247
  77. Nagy F, Kay SA, and Chua N-H (1988) A circadian clock regulates transcription of the wheat *Cab-1* gene. *Genes Dev.* 2, 376-382
  78. Njus D, Sulzman FM, and Hastings JW (1974) Membrane model for the circadian clock. *Nature* 248, 116-120
  79. Packer L and Glazer AN ed (1988) *Methods Enzymol.* 167 (*Cyanobacteria*)
  80. Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17-54
  81. Roenneberg T and Carpenter EJ (1993) Daily rhythm of O<sub>2</sub>-evolution in the cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. *Marine Biol.* 117, 693-697
  82. Rojek R, Harms C, Hebel M, and Grimme LH (1994) Cyclic variations of photosynthetic activity under nitrogen fixing conditions in *Synechococcus* sp. RF-1. *Arch. Microbiol.* 162, 80-84
  83. Saez L and Young MW (1996) Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins Period and Timeless. *Neuron* 17, 911-920
  84. Sauman I and Reppert SM (1996) Circadian clock neurons in the silkworm *Anthearea pernyi*: novel mechanisms of period protein regulation. *Neuron* 17, 889-900
  85. Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, and Sherman LA (1994) Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* 176, 1586-1597
  86. Sehgal A, Price J, Man B, and Young MW (1994) Circadian behavioral rhythms and molecular oscillations of *per* RNA abolished by a new *Drosophila* mutation, *timeless*. *Science* 270, 808-810
  87. Stal LJ and Krumbein WE (1985) Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp.

- grown under alternating light-dark cycles. Arch. Microbiol. 143, 67-71
88. Stal LJ and Krumbein WE (1987) Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch. Microbiol. 149, 76-80
  89. Suda S, Kumazawa S, and Mitsui A (1992) Change in the H<sub>2</sub> photoproduction capacity in a synchronously grown aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. Arch. Microbiol. 158, 1-4
  90. Sweeney BM and Borgese MB (1989) A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. J. Phycol. 25, 183-186
  91. Taylor WR (1979) *Studies on the bioluminescent glow rhythm of Gonyaulax polyedra*. Dissertation. University of Michigan
  92. Thiel T (1994) Genetic analysis of cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. ed. Bryant DA (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp. 581-611
  93. Tsinoremas NF, Ishiura M, Kondo T, Tanaka K, Takahashi H, Johnson CH, and Golden SS (1996) A sigma factor that modifies the circadian expression of a subset of genes in cyanobacteria. EMBO J. 15, 2488-2495
  94. Tsinoremas NF, Shaefer MR, and Golden SS (1994) Blue and red light reversibly control *psbA* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Biol. Chem. 269, 16143-16147
  95. Van Gelder RN, Bae H, Palazzolo MJ, and Krasnow MA (1995) Extent and character of circadian gene expression in *Drosophila melanogaster*: identification of twenty oscillating mRNAs in the fly head. Curr. Biol. 12, 1424-1436
  96. Wolk CP, Cai Y, and Panoff J-M (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5355-5359
  97. Wolk CP, Elhai J, Kuritz T, and Holland D (1993) Amplified expression of a transcriptional pattern formed during development of *Anabaena*. Mol. Microbiol. 7, 441-445
  98. Zeng H, Hardin PE, and Rosbash M (1994) Constitutive overexpression of the *Drosophila period* protein inhibits *period* mRNA cycling. EMBO J. 13, 3590-3598
  99. Zeng H, Qian Z, Myers MP, and Rosbash M (1996) A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. Nature 380, 129-135

## 脊椎動物の時計遺伝子

海老原史樹文・吉村崇・鈴木亨  
名古屋大学農学部 資源生物環境学科  
動物機能制御学講座

### はじめに

高等動物のうち、遺伝学研究が最も進んでいる種は、マウスである。マウスにはさまざまな遺伝特性を持つ近交系やミュータント系が多数存在し、長年の遺伝学的データの蓄積に加え、取り扱い易さや比較的世代交代が早いことから、遺伝解析に最も適した哺乳動物として利用されている。特に最近では、マイクロサテライトなど DNA 多型マーカーが充実するなど連鎖解析技術の進歩に加え、YAC ライブラリーなどの開発による物理的地図作成技術の進歩、さらに、長年に渡る膨大な遺伝学データが蓄積し、インターネットを介して瞬時にデータ検索できる情報科学の進歩などにより、ますますマウスの重要性が増してきている。したがって、概日リズムに関する遺伝学研究もマウスを用いたものが多い。マウス以外の哺乳類ではハムスターやラットを用いた研究があるが、これらについては、マウスほど十分な遺伝学データの蓄積がないため解析が進んでいない。しかし、最近新しいマッピング解析技術として RLGS (restriction landmark genome scanning)法が開発され、ハムスターでもリンケージマップが作成されたことから(1)、今後これらの動物でも時計遺伝子の解析が可能となってゆくだらう。哺乳類以外の脊椎動物で注目すべきは、ゼブラフィッシュやメダカなどの魚類であろう。これらの魚は、体が小さいため飼育スペースを取らず、世代交代が速いうえ、大量に子孫を得ることができるので、突然変異誘発物質による時計遺伝子の分離も効率に行えるものと期待できる。しかし、問題はリズムの測定に関することで、遊

泳行動ではそれほど明瞭なリズムが得られない。米国でゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子の分離が計画されているが、この点の克服が成功への分かれ道である。

時計遺伝子は、ショウジョウバエの *per* や *timeless*、アカパンカビの *frq* など振動の発現に直接組み込まれていると考えられる遺伝子であるが、脊椎動物でこれに該当する遺伝子は見つかっていない。しかし、概日リズムに影響する遺伝子は多数存在する。従って、本稿では、これらの遺伝子を概日リズム関連遺伝子としてまとめた。

### 時計遺伝子へのアプローチ

突然変異により表れた表現型から、古典的メンデル遺伝に基づいた解析により遺伝子を同定することは、遺伝学の基本的手法である。これを Forward genetics と呼んでいる。一方、遺伝子工学や細胞工学の進歩に伴い、遺伝子を直接操作することができるようになり、遺伝子の働きや発現を変化させて表現型への影響を見ようとするいわゆる Reverse Genetics と呼ばれる手法が盛んに用いられるようになった。遺伝子ターゲットングやアンチセンス DNA 法などがこれに当たる。また、概日リズムの基本的性質である、周期の温度補償性、光による位相反応性、周期が約 24 時間で持続する自律性などは全ての生物に共通しているが、このような時計の生理学的相同性から、概日リズム発現の分子機構に相同性が存在するものと考え、今までにクローニングされた時計遺伝子との相同遺伝子を検索する試みが行われている。これら以外

にも、Differential Display 法により概日リズムを示す mRNA を検出し遺伝子にアプローチする方法などが行なわれている。

### Forward Genetics

Forward Genetics はクラシックな手法であるが、最近、SSLP (simple sequence length polymorphism) などの DNA 多型マーカーが多数マッピング (マウスで約 8000 のマーカーがマッピングされている) され、また、マウスの種間・亜種間交配を利用して詳細な連鎖解析が可能になるなどの連鎖解析技術の進歩やポジショナルクローニング技術の進歩、さらに、マウスデータベースの充実などにより、ネオクラシックと呼ばれる様に Forward Genetics の進展には著しいものがある。Forward Genetics を用いた時計遺伝子へのアプローチは、まず、概日リズムの突然変異を見いだすことから始まるが、現在までに得られた突然変異遺伝子は、化学変異原物質 (ENU: N-エチル-N-ニトロソ尿素など) を用いて人為的に誘発したものと、自然発症したものとに分けることができる。前者には、マウスの *Clock* (2)、*Whl* (3) が染色体上へのマッピングが完了している。*Clock* は半優性型の遺伝をし、ヘテロ接合体では周期が 24 時間より長く (野生型は 24 時間より短い)、ホモ接合体では最初 27-28 時間の極端に長い周期を示した後リズムが消失する。*Whl* も同様に半優性遺伝子で、周期が 24 時間より長くなる。また、この突然変異マウスは回転行動などの異常行動を示し、さらに光に対する反応性にも異常が認められる。自然発症した突然変異では、ハムスターで発見された *tau* 突然変異遺伝子がある (4)。これは哺乳類で最初に発見された概日リズム突然変異遺伝子で、野生型のハムスターの周期はほぼ 24 時間に近いが、この遺伝子をヘテロ接合体で持つと周期が 22 時間となり、ホモ接合体では 20 時間となる。*tau* 突然変異ハムスターは、概日リズムの生理機構解明のために利

用され成果をあげているが、マウスのような遺伝学的手法が使えないため、今のところ遺伝子クローニングなどへの研究の進展はない。

Forward Genetics を使ったもう一つのアプローチは、既存の系統を使った QTL (Quantitative trait locus) 解析である。QTL 法は、量的形質に関連する複数の遺伝子座をマッピングする方法として新しく登場した (5)。一般に、行動などの形質は複数の遺伝子が関与する量的形質としてとらえられるが、従来は、このような複数の遺伝子が関与する形質を遺伝子レベルで解析することが困難であった。しかし、最近の分子遺伝学的技術の向上に伴い、高密度な遺伝子地図が作出されたことやデータ処理における統計方法の改良などにより、マウスで QTL 解析を行うことが可能となった。QTL 解析を行った研究はまだわずかであるが、色々な系統を用いた QTL 解析により、時計遺伝子が存在する複数の候補遺伝子座領域が明らかになってくるであろう。本稿では、QTL 解析に必要な情報として概日リズムに関する遺伝的差について報告した論文も含めた。

### Reverse Genetics

特定の遺伝子の機能を欠失させたり、過剰発現させたりして遺伝子の機能を個体レベルで解析しようとする Reverse Genetics は、遺伝子産物の生体内での機能を解析する有効な手段として広く用いられている。概日リズムに関しても、特定の遺伝子産物を欠失させるノックアウトマウスを用いた研究がいくつかの研究室で行なわれているが、発表されているものは多くない。この様なジーンターゲット法は、特定の機能分子の生体内での役割を探るうえで有効な手段となることは間違いないが、一方で、せっかく作っても他の遺伝子が機能を代償してしまうなどの理由で、表現型が野生型と変わらないこともよくあると言われている。高等動物の概日リズムに関しては、今のところ時計遺伝子

が分かっていないが、候補遺伝子が見つければ、原因遺伝子と見極めるために行う rescue 実験として重要である。

### 相同遺伝子の検索

今までにクローニングされている時計遺伝子は、ショウジョウバエの *per*、*timeless*、アラビドプシスの *toc* とアカパンカビの *frq*、シアノバクテリアの三つの ORF(D,E,F)であるが、これらの間には相同性が見られない。高等動物では、齧歯類において相同性遺伝子の検索を *per* 遺伝子について調べた報告がいくつかある。

### 振動体組織における時計関連遺伝子

脊椎動物の概日系は生物時計本体である振動体と、外界からの情報を振動体に伝える入力系、振動体の時間情報を様々な生理リズムに発現する出力系に分けることができる。振動体は、種によっても異なるが、一般に、網膜、松果体、視交差上核に存在すると言われている。本稿では、これらの組織について、概日リズムに関連する遺伝子や遺伝子発現などを扱ったものをそれぞれの機能分子ごとにまとめた。

### 文献

1. Okazaki Y, Okuizumi H, Ohsumi T, Nomura O, Takada S, Kamiya M, Sasaki N, Matsuda Y, Nishimura M, Tagaya O, Muramatsu M, Hayashizaki Y (1996) A genetic linkage map of the Syrian hamster and localization of cardiomyopathy locus on chromosome 9qa2.1-b1 using RLGS spot-mapping. *Nature Genetics* 13:87-90
2. Vitaterna MH, King DP, Chang A-M, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, Essential

for circadian behavior. *Science* 264 :719-725

3. Pickard GE, Sollars PJ, Rinchik EM, Nolan PM, Bucan M (1995) Mutagenesis and behavioral screening for altered circadian activity identifies the mouse mutant, *Wheels*. *Brain Res* 705:255-266
4. Ralph MR and Menaker M (1988) A Mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227
5. Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ (1994) Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264:1715-1723

### A Forward Genetics

#### 1. 遺伝的差(系統差)

##### Mouse

1. Abe H, Kida M, Tsuji K, and Mano T (1989) Feeding cycles entrain circadian rhythms of locomotor activity in CS mice but not in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 45:397-401
2. Beau J (1988) Mise en evidence de correlats polygeniques des caracteristiques du rythme de l'activite chez un Mammifere: Etude de deux lignees de souris consanguines C57BL/6By et BALB/cBy. *C R Acad Sci* 307:37-40
3. Castellano CS, Puglisi-Allegra S, Renzi P, Oliverio A (1985) Genetic differences in daily rhythms of pain sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 23:91-92
4. Connolly MS, Lynch CB (1981) Circadian variation of strain differences in body temperature and activity in mice. *Physiol Behav* 27:1045-1049
5. Connolly MS, Lynch CB (1983) Classical genetic analysis of circadian body temperature rhythms in mice. *Behav*

- Genetics 13:491-500
6. Ebihara S, Tsuji K, Kondo K (1978) Strain differences of the mouse's free-running circadian rhythm in continuous darkness. *Physiol Behav* 20:795-799
  7. Ebihara S, Tsuji K (1976) Strain differences in the mouse's wheel-running behavior. *Japanese Psychological Research* 18:20-29
  8. Ebihara S, Tsuji K (1980) Entrainment of the circadian activity rhythm to the light cycle: effective light intensity for a Zeitgeber in the retinal degenerate C3H mouse and the normal C57BL mouse. *Physiol Behav* 24:523-527
  9. Ebihara S, Goto M, Oshima I (1988) The phase-shifting effects of pentobarbital on the circadian rhythm of locomotor activity in the mouse: strain differences. *Brain Res* 454:404-407
  10. Ebihara S, Goto M, Oshima I (1988) Different responses of the circadian system to GABA-active drugs in two strains of mice. *J Biol Rhythms* 3:357-364
  11. Gilliam DM, Collins A (1983) Circadian and genetic influences on tissue sensitivity and sleep time to ethanol in LS and SS mice. *Physiol Behav* 18:803-808
  12. Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S (1989) Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res* 7:195-204
  13. Goto M, Ebihara S (1990) The influence of different light intensities on pineal melatonin content in the retinal degenerate C3H mouse and the normal CBA mouse. *Neurosci Lett* 108:267-272
  14. Hotz MM, Connolly MS, Lynch CB (1987) Adaptation to daily meal-timing and its effect on circadian temperature rhythms in two inbred strain of mice. *Behav Genet* 17:37-51
  15. Kempf E, Mandel P, Oliverio A, Puglisi-Allegra S (1982) Circadian variations of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine in specific brain areas of C57BL/6 and BALB/c mice. *Brain Res* 232:472-478
  16. Lassalle JM, Le Pape G (1978) Locomotor activity of two inbred strains of mice in a seminatural and a breeding cage environment. *Behav Genet* 8:371-376
  17. Lucas LA, Eleftheriou BE (1980) Circadian variation in concentrations of testosterone in the plasma of male mice: A difference between BALB/cBy and C57BL/6By inbred strains. *J Endocrinol* 87:37-46
  18. Malorni W, Oliverio A, Bove D (1975) Analyse genetique du rythme d'activite circadien chez la Souris. *C.R.Acad.Sc.Paris* 281:1479-1484
  19. Peleg L, Nesbitt MN, Ashkenazi IE (1982) A strain difference in the daily rhythm of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in the mouse. *J Comp Physiol A* 148:137-142
  20. Possidente B, Hegmann JP (1980) Circadian complexes: Circadian rhythms under common gene control. *J Comp Physiol B* 139:121-125
  21. Possidente B, Hegmann JP (1982) Gene differences modify Aschoff's rule in mice. *Physiol Behav* 28:199-200
  22. Possidente B, Hegmann JP, Carlson L, Elder B (1982) Pigment mutations associated with altered circadian rhythms in mice. *Physiol Behav* 28:389-392
  23. Rosenwasser AM (1990) Circadian activity rhythms in BALB/c mice: A weakly-

- coupled circadian system? *J Interdiscipl Cycle Res* 21:91-96
24. Roussel B, Turrillot P, Kitahama K (1984) Effect of ambient temperature on the sleep-waking cycle in two strains of mice. *Brain Res* 294:67-73
  25. Schwartz WJ and Zimmerman P (1990) Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci* 10; 3685-3694
  26. Sothorn RB, Halberg F, Nelson W (1979) Strain-difference in circadian murine chronotolerance to the antidepressant drug nomifensine. *Chronobiologia* 6:397-404
  27. Symons JP (1973) Wheel-running activity during *ad lib* and food-deprivation conditions in four inbred mouse strains. *Bull Psychonom Soc* 1:78-80
  28. Tsuji K, Ebihara S, Ohkouchi O (1982) Strain differences in drinking and eating activities of the inbred mice. *Tohoku Psychologica Folia* 41:147-157
  29. Wax TM (1977) Effects of age, strain, and illumination intensity on activity and self-selection of light-dark schedules in mice. *J Comp Physiol Psychol* 91:51-62
- Rat**
30. Bauer MS (1990) Intensity and precision of circadian wheel running in three outbred rat strains. *Physiol Behav* 47:397-401
  31. Buttner D, Wollnik F (1984) Strain-differentiated circadian and ultradian rhythms in locomotor activity of the laboratory rat. *Behav Genet* 14:137-152
  32. Rosenwasser AM (1993) Circadian drinking rhythms in SHR and WKY rats: Effects of increasing light intensity. *Physiol Behav* 53:1035-1041
  33. Rosenwasser AM, Pellowski MW, Hendley ED (1996) Circadian timekeeping in hyperactive and hypertensive inbred rat strains. *Am J Physiol* 271:R787-796
34. Scheuch GC, Silver J (1982) Ontogeny of the suprachiasmatic nucleus in genetically anophthalmic mice: anatomical and behavioral studies. In *Melatonin Rhythm Generating System* (D.C.Klein ed.) pp 20-41, Karger, Basel.
  35. Webb SM, Champney TH, Lewinski AK, Reiter RJ (1985) Photoreceptor damage and eye pigmentation: Influence on sensitivity of rat pineal N-acetyltransferase activity and melatonin levels to light at night. *Neuroendocrinol* 40:205-209
- Hamster**
36. Pohl H (1983) Strain differences in responses of the circadian system to light in the Syrian hamster. *Experientia* 39:372-374
  37. Puchalski W, Lynch GR (1991) Circadian characteristics of Djungarian hamsters: Effects of photoperiodic pretreatment and artificial selection. *Am J Physiol* 261:R670-R676
- 2.QTL 解析**
38. Hofstetter JR, Mayeda AR, Possidente B, Nurnberger JI (1995) Quantitative trait loci (QTL) for circadian rhythms of locomotor activity in mice. *Behav Genetics* 25:545-556
  39. Mayeda AR, Hofstetter JR, Belknap JK, Nurnberger JI Jr (1996) Hypothetical quantitative trait loci (QTL) for circadian period of locomotor activity in CXB recombinant inbred strain. *Behav Genetics* 26:505-511

### 3.突然変異

#### TAU MUTANT HAMSTER

40. Biello SM and Mrosovsky N (1996) Phase response curves to neuropeptide Y in the wildtype and *tau* mutant hamsters. *J Biol Rhythms* 11:27-34
41. Grace MS, Wang LA, Pickard GE, Besharse JC, Menaker M (1996) The *tau* mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Res* 735:93-100
42. Grosse J, Loudon ASI and Hastings MH (1995) Behavioural and cellular responses to light of the circadian system of *tau* mutant and wild-type syrian hamsters. *Neurosci* 65:587-597
43. Hurd MW, Zimmerman KA, Lehman MN, Ralph MR (1995) Circadian locomotor rhythms in aged hamsters following suprachiasmatic transplant. *Am J Physiol* 38: R958-R968
44. Menaker M and Rafinetti R (1993) The *tau* mutation in golden hamsters. In *Molecular Genetics of Biological Rhythms* (ed. M.Young) pp.255-269, Dekker, New York
45. Mrosovsky N, Salmon PA, Menaker M, and Ralph MR (1992) Non-photoc phase shifting in hamster clock mutants. *J Biol Rhythms* 7:41-49
46. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978
47. Ralph MR and Menaker M(1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227
48. Scarbrough K, Turek FW (1996) Quantitative differences in the circadian rhythm of locomotor activity and

vasopressin and vasoactive intestinal peptide gene expression in the suprachiasmatic nucleus of *tau* mutant compared to wildtype hamsters. *Brain Res* 736:251-259

49. Shimomura K, and Menaker M (1994) Light induced phase shifts in *tau* mutant hamsters. *J Biol Rhythms* 9:97-110
50. Stirling JA, Grosse J, Loudon ASI, Hastings MH, Maywood ES (1995) Gonadal responses of the male *tau* mutant syrian hamster to short-day-like programmed infusions of melatonin. *Biol of Reprod* 53:361-367
51. Stirling JA, Hastings MH, Loudon ASI, Maywood ES (1996) The *tau* mutation in the syrian hamster alters the photoperiodic responsiveness of the gonadal axis to melatonin signal frequency. *Endocrinol* 137:2183-2186

#### MOUSE *CLOCK* GENE

52. Florez JC, Takahashi JS (1995) The circadian clock - from molecules to behaviour. *Ann Med* 27:481-490
53. Menaker M, Takahashi JS (1995) Genetic analysis of the circadian system of mammals - properties and prospects. *Seminars in the Neurosciences* 7:61-70
54. Takahashi JS (1995) Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. (Review) *Annu Rev of Neurosci* 18:531-553
55. Takahashi JS, Hoffman M (1995) Molecular biological clocks. *Am Sci* 83:158-165
56. Takahashi JS, Pinto LH, Vitaterna MH (1994) Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* 264 :1724-1733
57. Turek FW, Pinto LH, Vitaterna MH, Penev

PD, Zee PC, Takahashi JS (1995) Pharmacological and genetic approaches for the study of circadian rhythms in mammals. (Review) *Frontiers in Neuroendocrinology* 16:191-223

58. Vitaterna MH, King DP, Chang A-M, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, Essential for circadian behavior. *Science* 264 :719-725

#### Other Genes

59. Norlan PM, Sollars PJ, Bohne BA, Ewens WJ, Pickard GE, Bucan M (1995) Heterozygosity mapping of partially congenic lines: Mapping of a semi-dominant neurological mutation, *wheels* (*Whl*), on mouse chromosome 4. *Genetics* 140:245-254
60. Pickard GE, Sollars PJ, Rinchik EM, Nolan PM, Bucan M (1995) Mutagenesis and behavioral screening for altered circadian activity identifies the mouse mutant, *Wheels*. *Brain Res* 705:255-266

#### B Reverse Genetics

##### 1.トランスジェニック,ジーンターゲットイング

61. Groblewski TA, Nunez AA, Gold RM (1981) Circadian rhythms in vasopressin-deficient rats. *Brain Res Bull* 6:125-130
62. Honrado GI, Johnson RS, Golombek DA, Spiegelman BM, Papioannou VE, Ralph MR (1996) The circadian system of *c-fos* deficient mice. *J Comp Physiol A* 178:563-570
63. Lemmer B, Mattes A, Bohm M (1993) Circadian blood pressure variation in

transgenic hypertensive rats. *Hypertension* 22:97-101

64. Lemmer B, Witte K, Makabe T (1994) Effects of enalaprilat on circadian profiles in blood pressure and heart rate of spontaneously and transgenic hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharm* 23:311-314
65. Sollars PJ, Ryan A, Pickard GE (1996) Altered circadian rhythmicity in the Wocko mouse, a hyperactive transgenic mutant. *Neuroreport* 7:1245-1248
66. Tober I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rütlicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA & Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380:639-642

##### 2.アンチセンス核酸

67. Gannon RL, Rea MA (1994) *In situ* hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Mol Brain Res* 23:338-344
68. Scarbrough K, Harney JP, Rosewell KL, Wise PM (1996) Acute effect of antisense antagonism of a single peptide neurotransmitter in the circadian clock. *Mol Brain Res* 37:21-31
69. Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Schlingensiepen KH, Herdegen T (1995) Block of *c-Fos* and *JunB* expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 7:388-393

#### C 相同遺伝子の検索

70. Beshlomo R, Ritte U, Nevo E (1996) Circadian rhythm and the per ACNGGN repeat in the mole rat, *Spalax Ehrenbergi*. Behav Genetics 26:177-184
71. Ishida N(1995) Molecular biological approach to the circadian clock mechanism. (Review) Neurosci Res 23:231-240
72. Ishida N, Matsui M, Nishimatsu SI, Murakami K, Mitsui Y (1994) Molecular cloning of a gene under control of the circadian clock and light in the rodent SCN. Mol Brain Res 26:197-206
73. Ishida N, Nishimatsu SI, Matsui M, Mitsui Y, Nohno T, Shibata N, Noji S (1994) Diurnal regulation of per repeat family in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. Neurosci Biobehav Rev 18:571-577
74. Ishida N, Nishimatsu S, Saida K and Mitsui Y (1988) Mouse hexamer repeat sequences homologous to the Drosophila *period* gene. Nucleic Acid Res 16:3581
75. Ishida N, Noji S, Ono K, Koyama E, Nohono T, Taniguti S, Tokunaga A, Fujii T and Mitsui Y (1991) Diurnal regulation of per repeat mRNA in the suprachiasmatic nucleus in rat brain. Neurosci Lett 122:113-116
76. Matsui M, Mitsui Y, Ishida N (1993) Circadian regulation of per repeat mRNA in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. Neurosci Lett 163:189-192
77. Rosewell KL, Siwicki KK, Wise PM (1994) A period (per)-like protein exhibits daily rhythmicity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. Brain Res 659:231-236

#### D 振動体組織における時計関連遺伝子

#### PINEAL AND EYE

##### Photopigment

78. Argamaso SM, Froehlich AC, McCall MA, Nevo E, Provencio I, Foster RG (1995) Photopigments and circadian systems of vertebrates. Biophys Chem 56:3-11
79. Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fisk S, De Grip W, Menaker M (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (*rd/rd*) J Comp Physiol A 169:39-50
80. Kawamura S, Yokoyama S (1996) Molecular characterization of the pigeon P-opsin gene. Gene 182:213-214
81. Max M, McKinnon PJ, Seidenman KJ, Barrett RK, Applebury ML, Takahashi JS, Margolskee RF (1995) Pineal opsin: A nonvisual opsin expressed in chick pineal. Science 267:1502-1506
82. Okano T, Yoshizawa T, Fukada Y (1994) Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. Nature 372:94-97
83. Possidents B, Hegmann JP, Carlson L, Elder B (1982) Pigment mutations associated with altered circadian rhythms in mice. Physiol Behav 28:389-392
84. Provencio I, Foster RG (1995) Circadian rhythms in mice can be regulated by photoreceptors with cone-like characteristics. Brain Res 694:183-190
85. Yoshimura T, Ebihara S (1996) Spectral sensitivity of photoreceptors mediating phase-shifts of circadian rhythms in retinally degenerate CBA/J (*rd/rd*) and normal CBA/N(+/+) mice. J Comp Physiol A 178:797-802
86. Yoshimura T, Nishio M, Goto M, Ebihara S (1994) Differences in circadian photosensitivity between retinally degenerate

- CBA/J mice (*rd/rd*) and normal CBA/N mice (+/+). *J Biol Rhythms* 9:51-60
87. Vitaterna MH, Wu JC, Turek FK, Pinto LH (1993) Reduced light sensitivity of the circadian clock in a hypopigmented mouse mutant. *Exp Brain Res* 95:436-442
- CREM
88. Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH, Sassone-Corsi P (1996) Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14140-14145
89. Foulkes NS, Duval G, Sassone-Corsi P (1996) Adaptive inducibility of CREM as transcriptional memory of circadian rhythms. *Nature* 381:83-85
90. Lalli E, Lee JS, Lamas M, Tamai K, Zazopoulos E, Natel F, Penna L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1996) The nuclear response to cAMP: Role of transcription factor CREM. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 351:201-209
91. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: An alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875-886
92. Sassone-Corsi P (1994) Rhythmic transcription and autoregulatory loops: Winding up the biological clock. *Cell* 78:361-364
93. Stele JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365:314-320
94. Takahashi JS (1993) Circadian clocks à la CREM. *Nature* 365:299-300
- Fra-2
95. Balor R, Klein DC (1995) Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J Biol Chem* 270:27319-27325
- Tryptophan Hydroxylase
96. Besancon R, Simonneaux V, Jouvet A, Belin MF, Fevre-Montange M, (1996) Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Mol Brain Res* 40:136-138
97. Florez JC, Seidenman KJ, Barrett RK, Sangoram AM, Takahashi JS (1996) Molecular cloning of chick pineal tryptophan hydroxylase and circadian oscillation of its mRNA levels. *Mol Brain Res* 42:25-30
98. Florez JC, Takahashi JS (1996) Regulation of tryptophan hydroxylase by cyclic AMP, calcium, norepinephrine, and light in cultured chick pineal cells. *J Neurochem* 67:242-250
99. Green C, Besharse JC (1994) Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J Neurochem* 62:2420-2428
100. Green CB, Cahill GM, Besharse JC (1995) Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retinal circadian oscillator *in vitro*. *Brain Res* 677:283-290
101. Green CB and Besharse JC (1996) Tryptophan hydroxylase mRNA levels are regulated by the circadian clock, temperature, and cAMP in chick pineal cells. *Brain Res* 738:1-7
- Melatonin (NAT, Mel-R)
102. Bernard M, Klein DC, Zatz M (1997)

- Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:304-309
103. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378:783-785
104. Coon SL, Mazuruk K, Rodriguez IR (1996) The human serotonin N-acetyltransferase gene (AANAT): Structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34:76-84
105. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MAA, Koonin EV, Klein DC (1995) Pineal serotonin N-acetyltransferase: Expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681-1683
106. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M (1986) Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231:491-493
107. Ebisawa T, Deguchi T (1991) Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem Biophysical Res Communicat* 177:1252-1257
108. Ebisawa T, Sasaki Y, Deguchi T (1995) Complementary DNAs for two arylamine N-acetyltransferases with identical 5' non-coding regions from rat pineal gland. *Eur J Biochem* 228:129-137
109. Ebisawa T, Suresh K, Michael R (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6133-6137
110. Goto M, Oshima I, Hasegawa M, Ebihara S (1994) The locus controlling pineal serotonin N-acetyltransferase activity (*Nat-2*) is located on mouse chromosome 11. *Mol Brain Res* 21:349-354
111. Klein DC, Roseboom PH, Coon SL (1996) New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: The first postcloning view. *Trends in endocrinol and metabolism* 7:106-112
112. Masson-Pévet M, Bianchi L, Pévet P (1996) Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: Comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res* 43:632-637
113. Maywood ES, Bittman EL, Ebling FJP, Barrett P, Morgan P, Hastings MH (1995) Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J Neuroendocrinol* 7:215-223
114. Park HT, Beak SY, Kim BS, Kim JB, Kim JJ (1996) Development expression of 'RZR-beta, a putative nuclear-melatonin receptor' mRNA in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 217:17-20
115. Recio J, Pévet P, Masson-Pévet M (1996) Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *J Neuroendocrinol* 8:839-845
116. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185
117. Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert

- SM (1996) Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel-1a melatonin receptor. *Endocrinol* 137:3469-3477
118. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC (1996) Melatonin synthesis: Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinol* 137:3033-3044
119. Slaugenhaupt SA, Roca AL, Liebert CM, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM (1995) Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1a) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* 27:355-357
120. Weaver DR, Liu C, Reppert SM (1996) Natures knockout - The Mel (1b) receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10:1478-1487
- その他
121. Gauer F, Kedzierski W, Craft CM (1995) Identifications of circadian gene expression in the rat pineal gland and retina by mRNA differential display. *Neurosci Lett* 187:69-73
122. Grechez-Cassiau A, Greve P, Guerlotte J, Collin JP, Voisin P (1995) Hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in the pineal gland of chicken embryo: Development of messenger RNA levels and regulation by serum. *Dev Brain Res* 88:204-211
123. Green CB and Besharse JC (1996) Use of a high stringency differential display screen for identification of retinal mRNAs that are regulated by a circadian clock. *Mol Brain Res* 37:157-165
124. Green CB, Besharse JC (1996) Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14884-14888
125. Tzavara ET, Pouille Y, Defer N, Hanoune J (1996) Diurnal variation of the adenylyl cyclase type I in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11208-11212
- SUPRACHIASMATIC NUCLEUS**
- CREM**
126. Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS, Greenberg ME (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260:238-241
127. Stehle JH, Pfeffer M, Kuehn R, Korf HW (1996) Light-induced expression of transcription factor ICER (inducible cAMP early repressor) in rat suprachiasmatic nucleus in phase-restricted. *Neurosci Lett* 217:169-172
- FOS,JUN**
128. Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma KI (1996) Substance P receptor regulates the photic induction of fos-related protein in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res* 708:135-142
129. Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma KI (1995) Circadian modulation in photic induction of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus cells of diurnal chipmunk, *Eutamias asiaticus*. *J Comp Physiol A* 176:159-167
130. Abe H, Rusak B, Robertson HA (1991)

- Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neurosci Lett* 127:9-12
131. Abe H, Rusak B, Robertson HA (1992) NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of Fos protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 28:831-835
  132. Bennett MR, Aronin N, Schwartz WJ (1996) *In vitro* stimulation of *c-fos* protein expression in the suprachiasmatic nucleus of hypothalamic slices. *Mol Brain Res* 42:140-144
  133. Boissin-Agasse L, Blanchard JM, Escot C, Fuminier F, Roch G, Boissin J (1996) Photic regulation of *c-fos* gene expression in the suprachiasmatic nucleus and the circadian rhythm of photosensitivity in the mink. *Mol Brain Res* 37:21-31
  134. Cai AH, Wise PM (1996) Age-related changes in light-induced jun-B and jun-D expression- Effects of transplantation of fetal tissue containing the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 11:284-290
  135. Earnest DJ, Iadarola M, Yeh HH, Olschowka JA (1990) Photic regulation of *c-fos* expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms. *Exp Neurol* 109:353-361
  136. Guido ME, Goguen D, Robertson HA, Rusak B (1996) Spontaneous and light-evoked expression of JunB-like protein in the hamster suprachiasmatic nucleus near subjective dawn. *Neurosci Lett* 217:9-12
  137. Guido ME, Rusak B, Robertson HA (1996) Spontaneous circadian and light-induced expression of JunB mRNA in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 732:215-222
  138. Kako K, Wakamatsu H, Ishida N (1996) *c-fos* CRE-binding activity of CREB/ATF family in the SCN is regulated by light but not a circadian clock. *Neurosci Lett* 216:159-162
  139. Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS (1990) Photic and circadian regulation of *c-fos* gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5:127-134
  140. Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS (1992) Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science* 255:1581-1584
  141. Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS (1996) Light, immediate-early genes, and circadian rhythms (Review) *Behav Genetics* 26:221-240
  142. Leard LE, MacDonald ES, Heller HC, Kilduff TS (1994) Ontogeny of photic-induced *c-fos* expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 5:2683-2687
  143. Menegazzi M, Carcereri De-Prati A, Grassi-Zucconi G (1994) Differential expression pattern of jun B and c-jun in the rat brain during the 24-h cycle. *Neurosci Lett* 182:295-298
  144. Peters RV, Aronin N, Schwartz WJ (1994) Circadian regulation of Fos B is different from c-Fos in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 27:243-248
  145. Rusak B, Robertson L, Wisden W, and Hunt SP (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248:1237-1240

146. Rusak B, McNaughton L, Robertson HA, Hunt SP (1992) Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNA in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Mol Brain Res* 14:124-130
147. Sanabria ERG, Scorza FA, Bortolotto ZA, Calderazzo LS, Cavalheiro EA (1996) Disruption of light-induced *c-fos* immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of chronic epileptic rats. *Neurosci Lett* 216:105-108
148. Shiromani PJ, Schwartz WJ (1995) Towards a molecular biology of the circadian clock and sleep of mammals. *Adv Neuroimmunol* 5:217-230
149. Silver R, Romero MT, Besmer HR, Leak R, Nunez JM, Lesauter J (1996) Calbindin-D-28K cells in the hamster SCN express light-induced fos. *Neuroreport* 7:1224-1228
150. Takeuchi J, Shannon W, Aronin N, Schwartz WJ (1993) Compositional change of AP-1 DNA-binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron* 11:825-836
151. Travnickova Z, Sumova A, Peters R, Schwartz WJ, Illnerova H (1996) Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN *c-fos* expression and resetting of circadian phase. *Am J Physiol* 40:R825-R831
152. Weaver DR, Roca AL, Reppert SM (1995) *c-fos* and jun-B mRNA are transiently expressed in fetal rodent suprachiasmatic nucleus following dopaminergic stimulation. *Dev Brain Res* 85:293-297
153. Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM (1992) D-1 dopamine receptors activate *c-fos* expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9201-9204
154. Weber ET, Gannon RL, Michel AM, Gillette MU, Rea MA (1995) Nitric oxide synthase inhibitor blocks light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm, but not *c-fos* expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res* 692:137-142
- Peptide etc.
155. Bult A, Hiestand L, Van der Zee EA, Lynch CB (1993) Circadian rhythms differ between selected mouse lines: a model to study the role of vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 32:623-627
156. Cagampang FRA, Yang J, Nakayama Y, Fukuhara C, Inouye ST (1994) Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 24:179-184
157. Cagampang FRA, Rattray M, Powell JF, Campbell IC, Coen CW (1996) Circadian changes of glutamate decarboxylases 65 and 67 mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 7:1925-1928
158. Cagampang FRA, Rattray M, Powell JF, Chong NWS, Campbell IC, Coen CW (1996) Circadian variation of EAAC1 glutamate transporter messenger RNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Mol Brain Res* 35:190-196
159. Carter DA, Murphy D (1992) Nuclear mechanisms mediate rhythmic changes in vasopressin mRNA expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 12:315-321
160. Chen G, van den Pol AN (1996) Multiple NPY receptors coexist in pre- and postsynaptic sites-inhibition of GABA

- release in isolated self-innervating SCN neurons. *J Neurosci* 16:7711-7724
161. Chong NWS, Cagampang FRA, Coen CW, Campbell IC, Powell JF (1996) Rapid identification of novel genes expressed in a circadian manner in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 7:1199-1203
162. Denis P, Dussailant M, Nordmann JP, Berod A, Saraux H, Rostene W (1993) Vasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine mRNA in the eye and suprachiasmatic nucleus of normal and monocularly enucleated rats. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 231:541-545
163. Duncan MJ, Cheng X, Heller KS (1995) Photoperiodic exposure and time of day modulate the expression of arginine vasopressin mRNA and vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nuclei of Siberian hamsters. *Mol Brain Res* 32:181-186
164. Gannon RL, Rea MA (1994) *In situ* hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Mol Brain Res* 23:338-344
165. Gao B, Moore RY (1996) Glutamic acid decarboxylase message isoforms in human suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 11:172-179
166. Glazer R, Gozes I (1994) Diurnal oscillation in vasoactive intestinal peptide gene expression independent of environmental light entraining. *Brain Res* 644:164-167
167. Inatomi T (1994) Expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemistry and *in situ* hybridization study. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 98:749-759
168. Ishida N, Matsui M, Mitsui Y, Mishina M (1994) Circadian expression of NMDA receptor mRNAs, epsilon-3 and zeta-1, in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Neurosci Lett* 166:211-215
169. Kawakami F, Okamura H, Tamada Y, Nakajima T, Iбата Y (1995) Changes in vasoactive intestinal peptide mRNA levels in the rat suprachiasmatic nucleus following p-chlorophenylalanine (PCPA) treatment under light/dark conditions. *Neurosci Lett* 200:171-174
170. Larsen PJ, Vrang N, Moller M, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS, Mikkelsen JD (1994) The diurnal expression of genes encoding vasopressin and vasoactive intestinal peptide within the rat suprachiasmatic nucleus is influenced by circulating glucocorticoids. *Mol Brain Res* 27:342-346
171. Mikkelsen JD, Larsen PJ (1993) Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: An immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *Histochemistry* 100:3-16
172. Mikkelesen JD, Larsen PJ, Ebling FJP (1993) Distribution of N-methyl D aspartate (NMDA) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 632:329-333
173. Nishiwaki T, Okamura H, Kanemasa K, Inatomi T, Iбата Y, Fukuhara C, Inouye ST (1995) Differences of somatostatin mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus under light-dark and constant conditions: An

- analysis by *in situ* hybridization. *Neurosci Lett* 197:231-234
174. Obrietan K, van den Pol AN (1996) Neuropeptide Y depresses GABA-mediated calcium transients in developing suprachiasmatic nucleus neurons: a novel form of calcium long-term depression. *J Neurosci* 16:3521-3533
175. O'Hara BF, Andretic R, Heller HC, Carter DB, Kilduff TS (1995) GABA-A, GABA-c, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Mol Brain Res* 28:239-250
176. Okamura H, Tanaka M, Kanemasa K, Ban Y, Inouye ST, Ibata Y (1995) *In situ* hybridization of *vgf* mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus: Co-localization with vasopressin/neurophysin and VIP/PHI. *Neurosci Lett* 189:181-184
177. Okamura H, Kawakami F, Tamada Y, Geffard M, Nishiwaki T, Ibata Y, Inouye ST (1995) Circadian change of VIP mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus following p-chlorophenylalanine (PCPA) treatment in constant darkness. *Mol Brain Res* 29:358-364
178. Okamura H, Tanaka M, Kanemasa K, Ban Y, Inouye ST, Ibata Y, (1994) *In situ* hybridization histochemistry of *vghmlf* mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus: Co-localization with vasopressin/neurophysin and VIP/PHI. *Neurosci Lett* 182:181-184
179. Peters RV, Zoeller RT, Hennessey AC, Stopa EG, Anderson G, Albers HE (1994) The control of circadian rhythms and the levels of vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nucleus are altered in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 639:217-227
180. Rivkees SA, Kelley MR (1994) Expression of a multifunctional DNA repair enzyme gene, apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE; Ref-1) in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res* 666:137-142
181. Rivkees SA, Weaver DR, Reppert SM (1993) Circadian and developmental regulation of Oct-2 gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 598:332-336
182. Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Honma K (1995) Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7396-7400
183. Shinohara K, Inouye ST (1995) Photic information coded by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev* 19:349-352
184. Sollars PJ, Pickard GE (1995) Vasoactive intestinal peptide efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in anterior hypothalamic transplants: correlation with functional restoration of circadian behavior. *Exp Neurol* 136:1-11
185. Tanaka M, Okamura H, Matsuda T, Shigeyoshi Y, Hisa Y, Chihara K, Ibata Y (1996) Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: A double labeling *in situ* hybridization study. *Neurosci Lett* 215:119-122
186. Takeuchi J, Nagasaki H, Shinohara K, Inouye ST (1992) A circadian rhythm of somatostatin messenger RNA levels, but not of vasoactive intestinal polypeptide-histidine isoleucine messenger RNA levels in rat suprachiasmatic nucleus.

Mol Brain Res 3:29-35

187. Tessonneaud A, Bonnefond C, Monnerie R, Viguier-Martinez MC (1995) Distribution of arginine-vasopressin and vasoactive intestinal peptide messenger RNA in the suprachiasmatic nucleus of the sheep. *Neurosci Lett* 191:5-8
188. Uhl GR, Reppert SM (1986) Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232:390-393
189. Yang J, Cagampang FRA, Nakayama Y, Inouye ST (1993) Vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA exhibits diurnal variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Mol Brain Res* 20:259-262
190. Yang-Jing, Inouye ST (1995) Studies on circadian rhythms of SS and VIP mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Acta Zoologica Sinica* 41:322-326
191. Yang J, Tominaga K, Otori Y, Fukuhara C, Tokumasu A, Inouye ST (1994) Day-night variation of preprosomatostatin messenger RNA level in the suprachiasmatic nucleus. *Mol Cell Neurosci* 5:97-102
192. Zoeller RT, Broyles B, Earley J, Anderson ER, Albers HE (1992) Cellular levels of messenger ribonucleic acids encoding vasoactive intestinal peptide and gastrin-releasing peptide in neurons of the suprachiasmatic nucleus exhibit distinct 24-hour rhythms. *J Neuroendocrinol* 4:119-124

## 第1回 AsiaPacific Pineal Meeting

大石 正  
国際委員会委員長  
奈良女子大・理・生物

第1回 AsiaPacific Pineal Meeting が浜松医大の森田之大先生のお世話で、3月28日から31日(1997年)にかけてグランドホテル浜松で開催されました。この会は、A. B. Lerner らによるメラトニン発見40周年を記念する意味もあり、意義深いものでした。次のようなセッションが開かれました。

1. Retina and Melatonin
2. Pineal Phototransduction and Photic Regulation
3. Regulation of Melatonin
4. Poster - 1
5. Melatonin Receptors
6. Effects of Melatonin
7. Poster - 2
8. Melatonin and Biological Rhythms
9. Melatonin in Humans

AsiaPacific という名称がついていましたが、ヨーロッパからもかなりの参加者があり、International な雰囲気でした。若い人達も松果体とメラトニンに関する世界の研究者に接して、大変刺激になったようです。

## 第3回日本時間生物学会総会

議長 田村康二

大会会長挨拶

学会会長挨拶

議題

1997年度大会について

運営委員会からの提案

報告

事務局報告

会計監査報告

その他

1997年度大会会長挨拶

閉会



### 事務局より

会誌発刊が始まって3年目を迎えます。学術刊行物の指定を受けることができ、郵送に伴う費用の軽減ができました。しかし、そのために会誌の内容充実が要求されています。その第一弾として、総説記事を掲載していくことにより、お忙しいところを無理にお願いして今回の「時計遺伝子」号ができました。筆者の先生には大変感謝しています。第二弾として、4巻1号で

は「SCN」を取り上げ、山口大の井上先生に取り纏めをお願いしてあります。同種の企画または、個別記事でも歓迎ですので、会誌充実のために積極的な投稿をお待ちしています。なお、会誌に掲載した記事の大部分は表紙に記載してあります本学会のホームページの中でも公開しています。