

目次

巻頭言	1
川村 浩	
特集“生物時計関連遺伝子”にあたって	3
富岡 憲治	
1.Immediate early geneのその後	5
安倍 博	
2.PASドメインとPAS因子-PAS因子は	12
環境適応素子として生まれた-	
池田 正明	
3.概日リズムにおけるクリプトクロームの機能	26
藤堂 剛・大安 裕美・藤 博幸	
4.植物の光周性と生物時計に関わる遺伝子	34
小野 道之	
技術ノート	
RT-PCR ELISA法を用いた遺伝子発現プロファイルの解析	44
長瀬 隆弘・小原 収	
海外レポート	
アメリカ留学レポート	54
福原 千秋	
関連集会報告	
1.第3回世界睡眠連合国際会議	57
田ヶ谷 浩邦	
2.ワークショップ「概日リズムの分子機構： 時計遺伝子の機能 ～若手の会～」に参加して	60
飯郷 雅之	
3.“Complex Clocks”に参加して	62
志賀 向子	
研究グループ	
北海道大学医学研究科・総合生理学講座・時間生物学分野	67
(旧医学部生理学第一講座)	
本間 研一	
第6回日本時間生物学会学術大会報告	70
運営委員議事録	71
規約検討委員会議事録	72
会計報告	73
執筆者のプロフィール	75
執筆要項	78

巻頭言

川村 浩

第二次大戦中にユダヤ人虐殺などで恐れられているドイツのヒトラーとわが国は同盟関係にあった。ではそのヒトラーが同盟国である日本や日本人に敬意を表していたかという、それが全く反対で、実は侮っていた。そのことは彼の著書「わが闘争」をよむと明瞭である。かれによると世界には文化創造型のアーリア人種（ここではゲルマン人、白人の意味）とそれより劣る文化保持型の日本人など、さらにそれ以下の黒人などの三種類の人種があり、日本人はアーリア人種の創造した文化を模倣し維持することは出来ても、新しい文化を創造する能力はないと明言していたのである。当時日本で出版された訳書ではこの部分は削除されていた。国民には隠していても、指導者たちがそのことを覚悟していたのならまだ救われるのであるが、それすらなかったのであるから情けない。そのことはドイツが日本に断り無しに突如独ソ不可侵条約を締結したときに、当時の平沼内閣がなすすべもなく「複雑怪奇」の言葉を残して退陣したことからも窺える。

何故こんな昔のことを今頃になってあえて書くかという、わが国の研究者は数の上ではヨーロッパ諸国に比べて多いと思うが、独創的な研究はいまだに少なく、ヒトラーの言葉があながち嘘とも言えないのではないかと何となく心配にな

ってきたからである。そのことは日本で国際学会を開催した場合に、本当に自分で金を払ってまで聞きにくる外国人が何人いるかということをも痛切に実感する機会に接したこともある。

独創的な研究の出発点はいうまでもなく、文献を精読して何が分かっていないかを知ることからはじまる。しかしいつもいつも文献ばかり気にしてそれに振り回されていると、結局は二番煎じの仕事に終わってしまう。

生理学の分野では戦前、慶応の加藤元一先生は神経線維麻酔部の非減衰伝導説を出して当時のドイツの大家Verwornの減衰伝導説を打ち破り、また神経や筋線維を一本に分けてall-or-noneの法則を証明され、微小生理学 (Microphysiology) の祖とさえ外国でいわれた。また満州医大（今の中国東北の瀋陽に戦前存在した日本の大令による医科大学）の久野寧先生は環境条件による発汗の状況の変化を明らかにされ汗の生理学の祖とされた方である。しかし今の日本人の書いた教科書にこれらの業績は正当に引用されているだろうか。自国の業績を正当に評価できないということは、結局目の前の外国文献の後追いに忙しく、研究の流れを自分の頭でしっかりとつかんでいないということではなかろうか。方向性をつかんでいれば、何をなすべきかも明らかになるで

あろう。そしてそのような大局を目指す体系的な研究から外国人にも真に尊敬される学問が生まれるのである。

私の恩師の時実利彦先生は日本の脳研究の先駆者であり、また日本の多くの大學に脳研究施設をつくる努力をされた方である。先生の奥様より頂戴した多額のご寄付に基づき、昨年から脳の高次機能や生体の統合機能について独創的なすぐれた業績をあげた55歳以下の研究者を奨励助成する意味で時実利彦記念賞（100万円）をさしあげることになった。これも日本にすこしでも外国の後追い研究ではない、本当に独創的な研究が育つことを願っての試みである。（毎年6月頃締め切りで募集しているので、三菱信託銀行本店営業部公益信託時実利彦基金係宛照会していただきたい。）

時間生物学の分野からも是非受賞者がでるような立派な研究の発展を期待している。

特集 “生物時計関連遺伝子” にあたって

富岡 憲治

山口大学理学部自然情報科学科・時間学研究所

生物時計の研究は、生物をブラックボックスとして扱うカイネティカルな研究から、1970～80年代の生理学的な研究へと進んできた。この過程で、生物時計が自律振動であるが環境サイクルに同調すること、温度補償性をもつこと、リミットサイクルに代表される物理的な振動現象の特性を持つことなど、多くの生物に共通した時計の特性がほぼ明らかにされた。また、特に動物では時計の局在性が研究され、脊椎動物では網膜、松果体、視交叉上核が、昆虫では前大脳、視葉などが時計組織として認められるに至っている。これらはいずれも光入力系のすぐ近傍に位置しており、光同調性への合目的性を示すと共に、時計の所在のある種の共通性をも物語っている。このように、カイネティカルな研究、比較生理学的研究を通して、生物時計が共通の性質を持つことが常に強調されてきた。このような共通性は、1980年代半ばから急激に進展してきた遺伝子レベルの研究においても見出されている²⁾。その最たるものは、フィードバック機構による遺伝子発現の周期性であろう。驚くべきことに、哺乳類と*Drosophila*で*per*、*tim*、*clock*、*bm11*、*cry*といった共通の遺伝子が時計機構の中で主要な役割を担っていることが証明さ

れつつある。

しかし、遺伝子レベルでの研究が進展するにつれ、共通面ばかりではなく特殊性もしばしば見出されるようになってきた。哺乳類と*Drosophila*では随所に少しずつ違いがあるし、もっと意外なことに、他の昆虫では*Drosophila*と同一の時計機構が働くことを示した報告はほとんどない。むしろ、少し違ったメカニズムが示唆されている例の方が多い。例えば、ヤマユガでは*per*、*tim*は同じ細胞で発現し、PER、TIM蛋白量の変動に概日リズムもあるが、PER、TIMの核移行は観察されていない³⁾。同様に竹田らの研究⁴⁾によれば、ワモンゴキブリのPER量は日周変動も核移行も示さない。さらに、らん藻やアカパンカビ、高等植物ではこれらとは大きく異なる遺伝子の関与が示されている。このような違いはどこに起因するのであろうか？

このような状況の下で、時計の成り立ちを知る上でも、これまでに時計に関連した遺伝子として注目されてきた遺伝子が、どういう素性のものなのかを知ることはとても重要なことのように思われる。そこで、この特集では、編集委員の先生方と相談の上で、時計関連遺伝子のいくつかについて特に詳しい方々に解説をお

願いました。大いに参考にさせていただきたいと思う。最後に、お忙しい中、貴重な時間を割いてご執筆くださった先生方に、この場をお借りして御礼申し上げます。

1. 千葉喜彦、高橋清久編：時間生物学ハンドブック、朝倉書店（1991）
2. Dunlap JC: Cell 96:271-290(1999)
3. Sauman I,Reppert SM: Neuron 17:889-900 (1996)
4. Takeda M,Okada M,Ichihara N: Complex Clocks,pp68 (2000)

Immediate early geneのその後

安倍 博

北海道大学医学部統合生理学講座

c-fos、*junB*などのimmediate early gene (IEG)が、ラットやハムスターの視交叉上核 (SCN) で光により位相依存的に発現誘導されることが報告されて10年が経った。SCNでのIEG光誘導は、行動のサーカディアンリズムの光位相反応性と共通する性質を持つことから、サーカディアン振動体の光同調に関わる重要な遺伝子と考えられてきた。しかし、その後の*c-fos*欠損マウスを用いた実験などから、その可能性は少ないとされ、現在もSCNのIEGとリズム光同調との因果関係は確かめられていない。IEGは、その機能が解らないままに、そのmRNAや蛋白免疫反応を細胞活性マーカーとして、体内時計研究に利用され続けている。本総説では、体内時計研究におけるIEGのこの10年間の成果と現状、および今後についてまとめた。

1. はじめに

c-fos、*JunB*、*c-Jun*、....体内時計研究の分野でも一世を風靡したいわゆるimmediate early gene (IEG)は、いったいどうなってしまったのだろうか。こんな疑問をもっている時間生物学研究者は多いであろう。1989~90年に5つの研究室からはほぼ同時に、ハムスターやラットの視交叉上核(SCN)で光により*c-fos*遺伝子発現が誘導されることが報告されて10年。当時としては、多くのリズム研究者が、現在の*Per*や*Clock*などの時計遺伝子発見のような衝撃を持って受けとめ、それらを研究対象として盛んにとりあげた。私が1989年にカナダ・ダルハウジ大学B.Rusak教授の研究室に留学したとき、ちょうど彼らがハムスターSCNの光による*c-fos*誘導についての最初の論文を*Science*に投稿したところであった²⁵⁾。そこで彼らの*c-fos*プロ

ジェクトに加わり、いくつかの実験を行うことになったのであるが、最近はその実験もやめてしまい、やはり*c-fos*はどうなったのかと疑問に感じていた。しかし、ここ数年の哺乳類時計遺伝子研究の加熱ぶりと次々と報告される新しいデータを見て、これまでの*c-fos*についてをもう一度まとめ直しておく必要性も感じていた。ちょうど昨年、この分野での*c-fos*研究先駆者の一人であるW. J. SchwartzとN. Aroninが、Society for Research on Biological Rhythmsの機関誌「*Biological Rhythms Bulletin*」に、*c-fos*の10周年を記念して、その後の経緯などを非常によくまとめた記事を掲載した。ここではそれを参考にしつつ、IEGのこれまでの成果と現状さらに今後の課題について、できるだけ簡単にまとめてみたい。なお、IEGのリズム研

究におけるこれまでの研究成果についての詳細は、いくつかの総説があるのでそれを参照されたい^{15, 19, 28)}。

2. IEGと光同調

*c-fos*は従来、原癌遺伝子 (proto-oncogene) の一つとして、細胞の癌化に関与する遺伝子とされていた。それが1984年以来、様々な刺激により神経細胞核内で発現誘導されることから、細胞内情報伝達系に関わる重要な転写因子をコードする遺伝子であることが明らかにされた。*c-fos*がコードするc-Fos蛋白は、やはり同じような刺激により発現する*junB*や*c-jun*などがコードするJunファミリー蛋白と二量体を形成し、AP-1 (activating protein-1) と呼ばれる転写調節複合体となる。AP-1は、DNAの特定のAP-1結合領域 (現在、様々な遺伝子のプロモーター領域に存在することが明らかにされている) に結合し、ターゲット遺伝子の転写を調節する。これらの遺伝子群は、刺激提示後比較的早く発現することからimmediate early gene、日本語に直訳すれば「最初期遺伝子」、と呼ばれるようになった。

10年前、リズム研究においてIEGを一躍主役に仕立て上げたのは、ハムスターやラットに光を照射するとSCNに*c-fos*や*junB*のmRNAおよびその蛋白 (c-Fos, JunB) が誘導されることであった^{8, 10, 17, 23, 25)}。IEG発現は、光パルス照射開始後30分でmRNAが、1-2時間で蛋白免疫反応がピークになり、光照射開始後2時間でmRNAが、6時間で蛋白が消失する。また発現は、5分以上の長さの光パルスで誘導される。IEGはその後、ラット・ハムスター以外の齧歯類 (マウス、シマリス、ジリス、デグーなど) やその他の哺乳類

(ヒツジ、ミンクなど) および鳥類 (ウズラ、ニワトリなど) でも研究されるようになった。その中でラット・ハムスターのSCNにおける光によるIEG発現誘導は、光による行動リズムの位相変位反応と共通点があったことから、リズム研究において注目されるようになった。

まず、(1)位相依存性：恒暗条件 (DD) で与える光の位相によってSCNでの発現が異なる。*c-fos*と*junB*は主観的暗期の光により強く発現し、主観的明期の光にはほとんど反応しない。これは夜行性種の行動リズム位相反応が主観的暗期にのみ起こることと一致する。この位相依存性は、c-FosとJunBからなるAP-1複合体のSCNにおけるDNA結合活性にも見られる¹⁸⁾。また*c-fos*発現の位相依存性はSCNに特異的で、やはり光により誘導される膝状体間葉 (IGL) での発現には位相依存性はない²²⁾。次に、(2)照度依存性：SCNでの発現は、与える光の強度によって異なる。IEGを発現させる光の強度の閾値が、行動リズム位相反応に必要な光の強度の閾値とほぼ一致する。この閾値は、動物の週齢や光照射までの恒暗条件の期間によって変化するが、その変化もIEG発現とリズム位相反応とで類似する^{31, 36)}。これらの他にも、(3)ハムスターとラットでは、SCNのIEG発現細胞はSCN腹外側領域に限られ、網膜視床下部路 (RHT) の投射部位と一致する。また、(4)RHTの神経伝達物質と考えられる物質の受容体 (例えばNMDA型興奮性アミノ酸受容体) 拮抗剤によって、ハムスターSCNのFos蛋白の光誘導が阻害される^{1-3, 5)}。これらの拮抗剤は行動リズムの光位相反応も阻害する。

光位相反応性との相関から、SCNのIEGはサーカディアン振動体の光同調系に関与する重要な遺伝子と考えられた。そし

てこの相関性から、両者の因果関係を確かめることが次の課題となった。しかし残念ながら、光同調遺伝子としての決定打は、現在も報告されていない。因果関係の証明を試みた研究では、IEG欠損マウスを用いた実験と、IEGのmRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験がある。しかし、ホモ接合型の*c-fos*欠損マウスでは、正常な*c-Fos*蛋白を持たないにも関わらず、明暗サイクルに同調し、正常な光位相反応を示す¹⁶⁾。この研究では、*c-Fos*以外のFosファミリー蛋白、例えばFosBやFra (Fos related antigen)-2が⁸⁾、*c-Fos*の代わりに補償的に作用した可能性も考えられるが、その事実は確かめられていない。*c-fos*以外のIEG欠損マウスを用いた研究も報告されていない。アンチセンスを用いた実験では、*c-fos*と*junB*のアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの脳脊髄液中に注入し、光による行動リズムの位相反応への影響を見たところ、それぞれのアンチセンスを単独で与えただけでは、光位相反応は阻害されなかった^{26, 35)}。しかし、*c-fos*と*junB*のアンチセンス両者を同時に与えると、位相反応は阻害された。しかしながらこの結果が、*c-Fos*と*JunB*のヘテロダイマーが光位相反応に関与することの強力な証拠とはならない。なぜならば、アンチセンス実験では常に起こる問題ではあるが、この実験では1種類の配列のアンチセンスオリゴでしか試しておらず、そのオリゴが配列非特異的に結合したことによって光位相反応に影響した可能性がある。この可能性は、この実験でSCNの*c-Fos*蛋白免疫反応は完全には阻害されなかったことから考えられる。この可能性を否定するためには、様々なコントロールオリゴを用いた実験が必要となるが、それについては検討さ

れていない。

また、SCNの*c-Fos*と光位相反応の関連については、昼行性シマリスと夜行性ラットやハムスターとでは結果が異なる。シマリスのSCNでの光による*c-Fos*蛋白誘導は、ハムスターと同じ主観的暗期に高い位相依存性を示すが、行動リズムは位相変位しない⁴⁾。昼行性齧歯類では、夜行性齧歯類とは異なるリズム光同調機構を持つことも考えられるが、夜行性種のような*c-Fos*と光位相反応との相関はない。

このような経緯で、現在でもIEGがサーカディアンリズムの光同調に関与する遺伝子であることの証拠はない。両者の因果関係を確かめる研究が、世界のどこかで今も行われているのかについても情報が無い。結局、依然SCN細胞活性のマーカーとして利用され続けているに過ぎない。マーカーとしての最近の研究では、例えば、ラットSCN振動体の光周期性(季節)による変動を、長日および短日周期下でのSCNの*c-Fos*光誘導リズムの変化を見ることによって確かめた研究や^{27, 32)}、光を無条件刺激とし、ラットの顔に吹き付ける風を条件刺激としたパブロフ型条件づけのテクニックを用いて、光の位相変位効果とSCNの*c-Fos*蛋白誘導を光以外の刺激に条件づけることができること(時計の学習?)を示した研究がある^{6, 7)}。睡眠研究では、ラットの腹外側視索前部(VLPO)で睡眠時に*c-Fos*免疫反応が増加すること³⁰⁾、さらにラットVLPOの*c-Fos*は明期に高く暗期に低い日周リズムを示すことから²¹⁾、この部位が睡眠-覚醒サイクルに重要であることが示された。他にも最近の時計機能を調べた実験の中で、細胞マーカーとして*c-fos*遺伝子発現または*c-Fos*蛋白免疫反応を利用して新たな知見を得ている研究は数多い。

3. IEGと非光同調

行動リズムは、光以外の刺激によって位相依存的に位相変位する（ケージ交換や回転輪導入による活動誘導性位相反応）が、SCNのIEGはこれらの刺激により発現誘導されない²⁰⁾。このことは、c-Fosの機能が、振動体位相反応（光刺激、非光刺激共通のもの）にあるのではなく、振動体への光入力系に特異的であることの根拠の一つとされていた。非光同調との関連では、IGLのc-Fosが非光同調に関与することが考えられたが、IGLでも光以外の刺激ではc-Fosは誘導されなかった²⁰⁾。また、c-fosをマーカーとして、制限給餌同調振動体やメトアンフェタミン依存性振動体など、SCN非依存性リズムの中樞（SCN外振動体）の局在を確かめることが考えられたが、その結論についての報告はない。

4. SCNで自己発現するIEG

ラットとハムスターのSCNにおけるIEGは、光による誘導とは別にDDで自発的に発現し、主観的明期に高く主観的暗期に低いサーカディアン変動を示す¹³⁾。この自己発現は、光誘導の場合とは異なり主にSCNの背内側部の細胞に見られる^{14, 33)}。この分布の違いから、自己発現するIEGは、光誘導されるIEGと機能的に異なり、むしろ振動系あるいは振動系から時計制御遺伝子への出力系に関与することが考えられた。しかし、少なくともc-fos欠損マウスでは、DDでも正常なフリーランリズムが維持される。

自己発現するc-fosをマーカーとしてSCNの振動をモニターするため、c-fosプロモーターにルシフェラーゼレポーターを組み込んだトランスジェニックマウス

が開発された。それにより*in vitro* SCNスライス培養系での発現リズムが確認された¹⁴⁾。しかしc-fos自己発現リズムの振幅は、他のSCN産生ペプチド（たとえばAVP）のリズム振幅に比べて小さく、振動のマーカーとしては必ずしも適当とは言えない。

5. IEGのSCNターゲット遺伝子

c-FosやJunBが形成するAP-1が、細胞内情報伝達において重要な転写調節因子であるにも関わらず、SCNでのAP-1のターゲット遺伝子は、未だ明らかにされていない。ラットSCN細胞でc-Fosと共存する神経ペプチドは、DDで自己発現する場合と光により発現誘導される場合とは異なる。自己発現するc-Fosの場合は、SCN背内側部のAVP、一方、光により誘導されるc-Fosは、腹外側部のVIPおよびGRPと共存する^{9, 24)}。このことから、SCNでのc-Fosのターゲットは機能により異なり、振動系についてはAVP、光入力系についてはVIP/GRPであると予測される。しかし、これらのいずれもAP-1により転写調節されることを示す直接的なデータはない。

また、DNAのAP-1結合領域に結合するAP-1複合体は、SCN腹外側部で光により誘導される場合とそうでない場合とは構成するIEG蛋白が異なる。DDで自発的に発現する場合は、FosBとJunDのヘテロダイマーによるAP-1が結合するのに対して、光刺激を与えた場合では、c-FosとJunBのヘテロダイマーおよびFra-2またはFosBとJunBのヘテロダイマーが誘導され結合する³⁴⁾。なお、自己発現する場合のAP-1がFosBではなくFra-2とJunDのヘテロダイマーであるとする報告もある¹¹⁾。いずれにせよ光刺激により、SCN腹外側部の

細胞でDNA結合するAP-1の構成は変化する。このことから、SCNでAP-1により転写調節されるターゲット遺伝子は、光刺激によりAP-1の構成が変化することにより異なる調節を受けることが考えられる。あるいは、AP-1の構成の違いにより、異なる遺伝子を転写調節している可能性も考えられる。しかし、AP-1の下流、あるいはSCNの他の遺伝子の上流におけるAP-1による調節については報告がない。

現在、哺乳類における時計遺伝子研究が盛んであるが、その主役である*mPer1*、*mPer2*は、*c-fos*と似たような光反応性を示す。この類似性から、光による*mPer*発現促進は、その上流でAP-1による転写調節を受けている可能性が考えられる。*mPer*のプロモーターにおけるAP-1結合領域の存在はまだ報告されていないが、*mPer*をはじめとするいわゆるサーカディアンフィードバックループに関わる時計遺伝子とIEGとの関わりについては、今後の研究展開が待たれるところである。

6. IEGのこれから

以上がリズム研究におけるIEGのこれまでの経緯である。この他にも取り残した情報があるかも知れないが、いずれにせよ当初考えられていた機能に対してネガティブな結論のまま現在に至っている。前述したように各種の刺激に対する細胞活性マーカーとして利用され続けているのが現状で、いわばIEGは、*mPer*などの時計遺伝子に主役の座を奪われ、脇役に回されたと言って良い。しかし、このまま脇役で終わるのであるだろうか？

それにしてはまだ確認されていない情報が多い。それらが確認されない限り、IEGが体内時計に関わる遺伝子である可能

性はまだ残されている。例えば、光同調における役割については、前述したアンチセンス実験や*c-fos*欠損マウス実験の結果では、それを完全に否定するには充分ではなく、確認すべき点はまだ残されている。また、*mPer1*のSCN光発現誘導は、cAMP系を介した細胞内情報伝達系(CREBのリン酸化)によることから、*c-fos*の光誘導の場合と類似する。前述したように*mPer1*のプロモータ領域にAP-1結合領域があるかはまだ確認段階であるが、IEGが*mPer1*の上流でサーカディアン振動体への光入力を調節している可能性はある。

振動系・出力系における役割についても同様である。前述のようにSCNの腹外側部と背内側部で発現様式・発現細胞が異なることから、IEGがSCNの振動系・振動出力系と入力系で異なる機能を持つことが考えられる。IEGによるAVPとVIPの上流での調節の有無やその機能的違いなど、興味深い問題は残されている。

現在の哺乳類体内時計研究では、時計遺伝子による振動生成の分子メカニズムが猛スピードで明らかにされようとしている。やがてそれも解明されて、入力-振動-出力を合わせた体内時計機構の全貌も次々と明らかにされていくであろう。その過程で、*c-fos*が再び、時計に重要なキー遺伝子として脚光を浴びることもあるかも知れない。このまま細胞マーカーとして、“a living fossil” となってしまうくないことを期待したい。

参考文献

- 1) Abe H, Rusak B, Robertson HA : Neurosci.Lett. 127: 9-12 (1991)
- 2) Abe H, Rusak B, Robertson HA : Brain Res. Bull. 28: 831-835 (1992)
- 3) Abe H, Rusak B: Neurosci. Biobehav. Rev. 18: 531-536 (1994)
- 4) Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma K : J Comp. Physiol. A 176: 159-167 (1995)
- 5) Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma K : Brain Res. 708: 135-142 (1996)
- 6) Amir S, Stewart J : Nature 379 :542-545 (1996)
- 7) Amir S, Stewart J : Neuroscience 83 : 657-661(1998)
- 8) Aronin N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz WJ : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5959-5962 (1990)
- 9) Castel M, Belenky M, Cohen s, Wagner S, Schwartz WJ : Eur. J Neurosci. 9: 1950-1960 (1997)
- 10) Earnest DJ, Iadarola M, Yeh HH, Olshowka JA : Exp. Neurol. 109: 353-361 (1990)
- 11) Francis-Bellan AM, Deprez P, Bacquet D : J Neurochem. 72: 841-847 (1999)
- 12) Geusz ME, Fletcher C, Block GD, Straume M, Copeland NG, Jenkins NA, Kay SA, Day RN : Curr. Biol. 7: 758-766 (1997)
- 13) Guido ME, Rusak B, Robertson HA : Brain Res. 732: 215-222 (1996)
- 14) Guido ME, Goguen D, Guido LD, Robertson HA, Rusak B : Neuroscience 90: 555-571 (1999)
- 15) Hastings MH, Ebling FJP, Grosse J, Herbert J, Maywood ES, Mikkelsen JD, Sumová A : Circadian Clocks and Their Adjustment, Ciba Foundation Symposium 183, pp 175-197, John Wiley & Sons, Chichester (1995)
- 16) Honrado GI, Johnson RS, Golombek DA, Spiegelman BM, Papaioannou V, Ralph MR : J Comp. Physiol. A 178: 563-570 (1996)
- 17) Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS : Neuron 5: 127-134 (1990)
- 18) Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS : Science 255:1581-1584 (1992)
- 19) Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS: Behav. Genet. 26: 221-240 (1996)
- 20) Mikkelsen JD, Vrang N, Mrosovsky N: Brain Res. Bull. 47: 367-376 (1998)
- 21) Novak CM, Nunez AA : Am. J Physiol. 275: R1620-R1626 (1998)
- 22) Peters RV, Aronin N, Schwartz WJ : Brain Res. 728: 231-241 (1996)
- 23) Rea MA : Brain Res. Bull. 23: 577-581 (1989)
- 24) Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM : J Comp. Neurol.372: 1-8 (1996)
- 25) Rusak B, Robertson HA, Wisden W, Hunt SP : Science 248: 1237-1240 (1990)
- 26) Schlingensiepen KH, Wollnik F, Kunst M, Schlingensiepen R, Herdegen T, Brysch W : Cell. Mol. Neurobiol. 14: 487-505 (1994)
- 27) Schwartz WJ, Takeuchi J, Shannon W, Davis EM, Aronin N : Neuroscience 58: 573-583 (1994)
- 28) Schwartz WJ, Aronin N, Takeuchi, J, Bennett MR, Peters RV : Seminars Neurosci. 7: 53-60 (1995)
- 29) Schwartz WJ, Aronin N : Biol. Rhythms Bull. 1(2): 2-5 (1999)

- 30) Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB : Science 271: 216-219 (1996)
- 31) Shimomura K, Kornhauser JM, Wisor JP, Umezumi T, Yamazaki S, Ihara NL, Takahashi JS, Menaker M : J. Biol. Rhythms 13: 305-314 (1998)
- 32) Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz WJ, Illnerová H : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7754-7758 (1995)
- 33) Sumová A, Trávníčková Z, Mikkelsen JD, Illnerová H : Brain Res. 801: 254-258 (1998)
- 34) Takeuchi J, Shannon W, Aronin N, Schwartz WJ : Neuron 11: 825-836 (1993)
- 35) Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon R, Bravo M, Zimmermann M, Schlingensiefen KH, Herdegen T : Eur. J. Neurosci. 7: 388-393 (1995)
- 36) Zhang Y, Kornhauser JM, Zee PC, Mayo KE, Takahashi JS, Turek FW : Neuroscience 70: 951-961 (1996)

PASドメインとPAS因子 -PAS因子は環境適応素子として生まれた-

池田 正明

埼玉医科大学 第一生理学教室

PASドメインは、最近相次いで発見された時計遺伝子CLOCKやBMAL1などに含まれていたことから急速に注目を集めることになったドメイン構造である。哺乳類やショウジョウバエではPASドメインを持つ因子はその殆どが転写因子として機能しており、ダイオキシンレセプターであるAhR、時計遺伝子CLOCK-BMAL1、低酸素状態に対する適応因子HIF-1 α はすべて転写因子として標的遺伝子の転写を調節する作用を通して特異的な機能を発現している。近年の3次元構造解析の進歩によってHERGなどのイオンチャンネルにもPASドメイン構造を持つものが発見され、また植物や細菌に至るまで光や酸素受容能とヒスチジンキナーゼなどの酵素活性を合わせ持つようなセンサーモジュールとしての機能を持つPAS因子が多数見出され、PASドメインは環境適応素子のコアドメインとして生物界に広く分布することが明らかになってきた。本稿ではPAS因子の構造を概観するとともにその機能について最近の知見をまとめた。

1. PASドメインの発見

CLOCKやBMAL1など時計遺伝子産物の多くがPASドメインをもつことが明らかになったのはここ2-3年の研究からであるが、最初の糸口は1980年代半ばに同定された*period (per)*遺伝子にさかのぼる。KonopkaとBenzerは1970年代はじめにキイロショウジョウバエにエチルメタンサルホン酸処理をしたものの中に、周期が24時間より短くなるもの(*per^s*)、長くなるもの(*per^L*)、無周期になるもの(*per⁰*)の3種の変異体があることを見つけていた³⁶⁾。1980年代に入りその遺伝子が単離され、周期変異を起こす遺伝子であることから*period (per)*と命名された⁵⁷⁾。当初*per*遺伝子産物の機能はプロテオグリカン類似の

配列があることから細胞間のシグナル伝達に関与する分子であろうと予想されていた。

時計遺伝子研究とは独立に、Crewsらは、ショウジョウバエから神経系の発達に関与すると思われる新しい転写因子をコードする遺伝子*single minded (sim)*をクローニングしていたが¹⁰⁾、その産物SIMがダイオキシンレセプターを核内に運ぶ転写因子として得られていたARNTと相同性のある領域があり、しかもその領域は*per*産物(PER)とも相同性のあることを見出し、3つの因子の頭文字をとってPASドメイン(PAS domain)と命名した(図1)⁴⁹⁾。

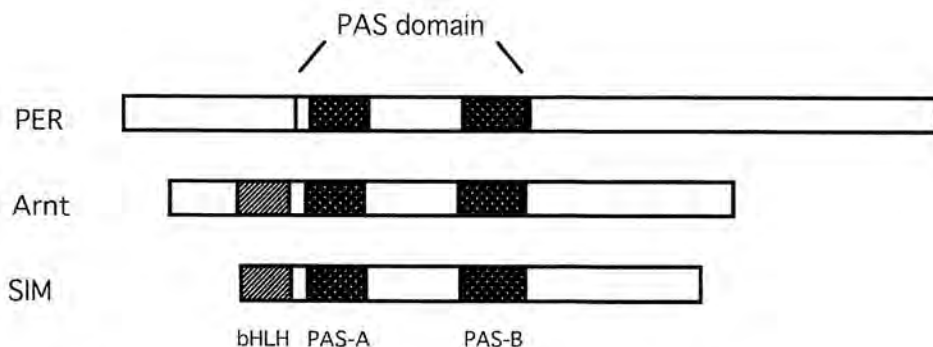


図1 PAS ドメイン

ショウジョウバエのPER, SIMおよびマウスARNTの構造を模式的に示した。3種のPAS因子は約250アミノ酸からなるPASドメインを持つ。PASドメインには約50アミノ酸からなる2個のリピード領域PAS-AとPAS-Bがある。ARNTとSIMにはDNA結合と二量体形成に関与するbHLHドメインがある。

PASドメインの機能はこの発見当時は不明であったが、bHLH-leucine zipper型転写因子からの類推から、二量体形成に関与するドメインではないかと予想された。Huangら³⁹⁾はPERのPASドメインが二量体形成に必要なかを検討した。*in vitro*の転写・翻訳系を用いてPERのホモ二量体とSIMとのヘテロ二量体形成を調べたところ、明らかな相互作用が観察され、PASドメインの機能の一つが二量体形成のインターフェースであることが証明された。またこのことから、ARNTやSIMと同様にPERも転写因子として働いているのではないかと急速に注目を集めることになった。その後、ホモロジー検索や立体構造予測、結晶化による構造解析などによって、哺乳類やショウジョウバエ以外にもPASドメインを持つ分子の存在が知られるようになった。それらの分子は、植物、アカパンカビ、シアノバクテリア、細菌など広く生物界に分布している。

2. PAS 因子の種類と機能

哺乳類においてPASドメインを持つ分子

を機能から分類すると、時計遺伝子やダイオキシンレセプターのように転写因子として働くもの、リン酸化酵素活性を持つもの、イオンチャンネルとして機能するものの3種が今までに同定されている。

転写因子としては、哺乳類では現在のところ20のPAS因子が知られており、PER1, PER2, PER3以外はすべてPASドメインのアミノ末端側にbHLH(basic helix-loop helix)ドメインを持っているbHLH-PAS型転写因子である。(表1) PAS型転写因子は生体内の様々な機能と関わっていることが知られているが、たとえばCLOCK, BMAL1それに3種のPERは生体リズムの形成などに関わっており、時計遺伝子と呼ばれている¹⁴⁾。またAhRはTCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)などのダイオキシン類と結合し、ARNTとヘテロ二量体を形成後、肝臓の代謝酵素チトクロームP450C (CYC1A1)などの転写調節領域にあるxenobiotic-responsive element(XRE)に結合して代謝酵素を誘導し、解毒や薬物代謝に関与している⁶²⁾(図2)。HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 α)はARNTと結合してhypoxia response element (HRE)に結

表1

哺乳類bHLH-PASスーパーファミリー

表に示したPER1,PER2, PER3にはbHLHドメインはない。HAT:histone acetyltransferase

遺伝子産物名	他の呼称	ヒト染色体	機能など
CLOCK		4q12	BMAL1とダイマーを形成。per1 プロモーター領域のE-boxに結合
BMAL1	MOP3, Arnt3, JAP3, TIC	11p15.1	CLOCKとダイマーを形成。per1 プロモーター領域のE-boxに結合
PER1	RIGUI	17p12-13.1	CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
PER2	KIAA03476		CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
PER3		1p36.21-33	CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
AhR		7p15	ダイオキシンレセプター、ARNTとヘテロダイマーを形成。xenobiotic-responsive element (XRE) に結合
AhRR			ARNTとヘテロダイマーを形成。XREに結合、AhRの作用を抑制
ARNT		1q21	AhRとヘテロダイマーを形成。XREに結合し、手トクロームP-4501A1などの発現を誘導
ARNT2			SIM1とヘテロダイマーを形成
HIF-1 α	MOP1	4q21-q24	低酸素により誘導、ARNTとヘテロダイマーを形成
HIF-2 α	EPAS1, MOP2, HLF, HRF	2p21-p16	低酸素により誘導
HIF-3 α		19q13.2	
NPAS1	MOP5	19q13.2-q13.3	胎生期と成体の神経系で発現
NPAS2	MOP4	2q13	BMAL1とヘテロダイマーを形成。in vitroでバゾプレッシン遺伝子の転写促進
NPAS3			胎生期の神経系、心臓、腎臓などで発現
SIM1		6q16.3-q21	ARNT2とヘテロダイマーを形成。発達期のparaventricular nucleus (PVN), anterior periventricular nucleus (aPV), supraoptic nucleus (SON)に発現
SIM2		21q22.2-q22.3	ダウン症関連領域
SRC-1		2q23	p300/CBP, PCAFと結合、核内ホルモンレセプターに結合、HAT
TIF2	GRIP1, NCoA-28		核内ホルモンレセプターに結合、HAT
RAC3	AIB1, ACTR, TRAM-1, p/CIP	20q12	乳癌、卵巣癌で増幅。p300/CBP, PCAFと結合、核内ホルモンレセプターに結合、HAT

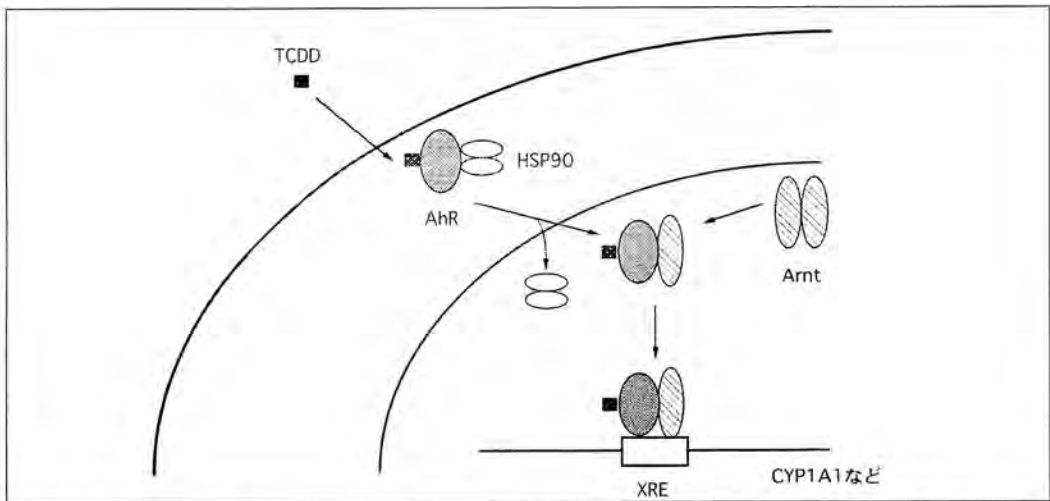


図2 ダイオキシンの作用とAhR-ARNT二量体 TCDDやPCB(ポリ塩化ビフェニール)、メチルコランスレン (3MC)は、細胞内に取り込まれるとAhR(aryl hydrocarbon receptor; Ah レセプター)と結合する。細胞質ではAhRは1分子当たり2個のHSP90(heat shock protein 90)と結合しているが、ダイオキシン類が結合すると核内へ移行し、HSP90がはなれると同時にARNTがPASドメインを介して結合し、AhR-ARNTヘテロ二量体を形成する。この二量体は薬物代謝酵素のCYP1A1やグルタチオンS-トランスフェラーゼのエンハンサー領域にあるXREに結合して転写を活性化する。

合してエリスロポエチンやVEGF (vascular endothelial growth factor)などの発現を誘導する。この反応は低酸素によって惹起される。ステロイドホルモンレセプターのコアクティベーターとして同定されたSRC-1などもbHLH-PAS型転写因子であることが知られている³⁹⁾。これらのPAS型転写因子の機能はどの因子がそれに関与しているかではなく、その因子がどのようなPAS因子と二量体を形成するかによって主に決められており、組み合わせが重要になっている。それは二種類のbHLH-PAS型転写因子が二量体を形成する時、その塩基性ドメインの組み合わせが、結合するDNA配列を決定していることに由来している。すなわち同じPAS型転写因子が関係していても、二量体を形成する相手が異なれば全く異なる機能発現に関与するということもあり得るのである。PAS型転写因子にはARNTのように、種々のPAS因子と二量体を形成するものとCLOCKのようにBMAL1という限られた相手とのみ二量体を形成し、時計機能など特定の機能を発現する因子がある。また同じ組み合わせでも、発現する細胞や組織が異なると機能が異なってくる可能性も考えられるが、この点に関してはまだ十分に調べられていない。

最近、哺乳類で転写因子以外にもPASドメインを持つ分子が発見された。それはHERGとよばれるKチャンネル⁴⁷⁾とPDE8A (cAMP specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A)というセリン-スレオニンキナーゼである²⁰⁾。HERGは細胞膜貫通ドメインを6個持つ膜蛋白で、N末端とC末端の両方が細胞質にあり、4個の分子が集合してイオノフォアを形成している。このイオンチャンネルのN末端側にPASドメインのあることが結晶構造の解析から明らかにされた。

このPASドメインの機能はまだ詳しく分かっていないが、HERGチャンネルのS4-S5リンカーとの相互作用に関与してチャンネル活性化の調節を行っている可能性があり、大変興味深い。またこのKチャンネルはQT延長症候群の原因遺伝子の一つと考えられ、同疾患罹患群からPASドメイン領域に変異が見つかった (図3)⁸⁾。

哺乳類では前述のようにPASドメインを持つ因子として、転写因子、イオンチャンネル、キナーゼが知られているが、ショウジョウバエにおいても哺乳類のPAS型転写因子やイオンチャンネルと相同性の高い因子が見つかった (表1)。その殆どはアミノ酸配列の相同性ばかりでなく、機能にも類似性がみられ、生物の進化を考える上でも興味深い。ショウジョウバエの全ゲノム配列が公開されたことにより、哺乳類の因子との対応が明らかになるものと思われる。

PASドメインを持つ分子は哺乳類やショウジョウバエから見出された分子の大半が転写因子であったことからPAS因子=転写因子と思われがちであるが、枯草菌から発見された胞子形成に関わると考えられるKinAは転写因子としての特徴を持たず、そのC末端にはヒスチジンキナーゼ (histidine kinase)活性を持つドメインのあることが同定された⁵³⁾。その後、他にも細菌にヒスチジンキナーゼドメインを持つ分子が多数あることが確認された。またシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)の赤色光受容分子フィトクロームにもヒスチジンキナーゼ様ドメインがあり、光センサーとして働いていること⁵²⁾、細菌のヘム結合性酸素感受性蛋白FixLは、ヒスチジンキナーゼ活性を持つ酸素センサーであること²⁴⁾などが次々に明らかにされ、PASドメインを持つ分子は真核生物から原核生物まで広く分布

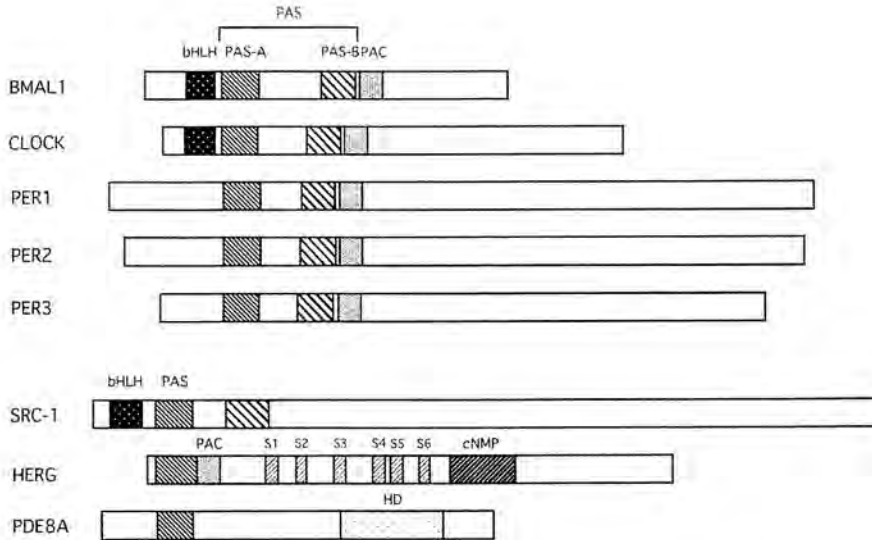


図3 PAS因子の構造

時計遺伝子には5個のPAS因子がある。BMAL1とCLOCKはともにbHLH-PAS型転写因子であり、bHLHドメインとそのC末端側にPASドメインがあり、PASドメインにはPAS-AとPAS-Bと呼ばれるリピート配列がある。またPASドメインのC末端にはPACモチーフと呼ばれる40~45アミノ酸からなる領域があり、PASドメインの折りたたみ構造と関連した配列であると考えられている。PER1、PER2、PER3はbHLHドメインはなく、PASドメインとPACモチーフがある。SRC-1にもbHLHドメインとPASドメインがある。HERG (human Ether-a-go-go)は膜貫通領域を6個もった膜蛋白構造をしており、N、C両末端が細胞質にある。膜貫通領域よりC末端側にはcNMP (cyclic nucleotide-monophosphatebinding domain)がある。PDE8A(cAMP-specific phosphodiesterase 8A)にはPASリピートが1箇所あり、HD (metal dependent phosphohydrolase with conserved 'HD' motif)がそのC末端側にある。ヒトの配列をもとに模式的に示した。

していることが知られるようになった。このようにPAS因子の中に、シグナルを受け取ってリン酸化を調節するなどセンサーモジュールとして機能している分子の存在が、クローズアップされることになった。これらのPAS因子はPASプラス因子 (PAS-Plus Protein)と呼ばれている¹²⁾。このように原核生物に見い出されたPAS因子はセンサーモジュールとして働くPASプラス因子のみであったが、フィトクロームと相互作用する因子としてツーハイブリッド法 (Two-hybrid method)によって最近クローニ

ングされたPIF3はPASドメインを持つばかりでなくそのC末端側にbHLHドメインがある転写因子様の構造をしていることがわかった⁵⁰⁾。このようにPASドメインは転写因子とセンサーモジュールとして広く生物界に分布していることがあらためて確認されたことになる。

3. PASドメインの構造と機能

bHLH-PAS型因子のPASドメインは250-300アミノ酸からなり、その中に約50アミ

ノ酸のより相同性の高いリピート配列があり、それぞれPAS-A、PAS-Bと呼ばれている。一方PASプラス因子は一つのPAS-AあるいはPAS-Bに相当するドメインを持っており、細菌のPASプラス因子であるPYP (Photoactive yellow protein)のPASドメインは立体構造のモデリング研究からARNTのPAS-Bドメインに非常によく似ていることが証明されている²³⁾。PASドメインは5ないし6個の β シートが α ヘリックスループに挟まれた構造をしており、リガンドやクロモフォアを取り込むグロブのような格好をしている¹²⁾。PAS型転写因子のPASドメインはPAS型転写因子とホモあるいはヘテロ二量体を形成するためのインターフェースとなっているが、ショウジョウバエのPERとTIMの相互作用やARNTあるいはAhRのGC box結合因子であるSp1との相互作用⁶⁷⁾のようにPAS因子以外の分子間の相互作用にも関与している。もう一つのPASドメインの機能は哺乳類のARNTや細菌のPYP、FixLのようなセンサーとしての機能である。しかしフィトクロームのクロモフォアの結合部位やHIF-1 α の酸素センサー部位はPASドメイン外にあることが知られており⁵⁵⁾、必ずしもセンサーの機能がPASドメインに位置しているとは限らない。

4. ダイオキシシンと AhR-ARNTによる薬物代謝酵素誘導機構

TCDDなどのダイオキシシン類は体内に吸収されると肝臓などでCYC1A1(チトクロームP-4501A1)などの薬物代謝酵素を誘導するが、この機構にはbHLH-PAS型転写因子であるAhRとARNTが関与している⁶⁸⁾。図2に示すように、細胞内に取り込まれたTCDDなどは、細胞質でAhRのPASドメイン内に存在するリガンド結合部位に結合

する。この時、同部位に2分子結合していたHSP90が離れ、AhRは核内へ移動し、核内でホモ二量体を形成していたARNTとヘテロ二量体を形成し、XREのTNGCGTGというDNA配列に結合する。このコア配列のGTGにはARNTの塩基性領域が結合し、TNGC側はAhRが認識していることが確かめられている。はじめARNTは細胞質でAhRと結合して核内にAhRを運ぶ因子として単離され命名されたが⁵²⁸⁾、実際には核内に主に存在していてAhRの核内運搬には働かないと考えられている。ARNTのC末端側にある転写活性化ドメインにはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を持つCBP/p300が結合しており³⁹⁾、AhR-ARNT二量体がXREに結合するとプロモーター領域のクロマチン構造が変化し、CYC1A1などの転写が活性化されるものと考えられる。また、このようなりガンドに依存して活性化される機構以外に、リン酸化などを介したリガンド非依存性のAhR-ARNT二量体によるCYC1A1遺伝子の転写活性化機構の存在も知られている⁴⁰⁾。ARNTに非常に相同性の高いbHLH-PAS型因子ARNT2も同定されている²⁷⁾。ARNT2もAhRとヘテロ二量体を形成し、XREに結合することが確かめられている。ARNTとの主な違いは発現部位であり³⁹⁾、*arnt2*領域欠損マウスでは胸腺の形成がみられない⁷⁰⁾。

哺乳類以外でもAhRやARNTに相同性の高い因子が同定されている。ショウジョウバエではAhRのホモログとしてSpineless (Ss)¹⁸⁾、そのパートナーとしてARNTに相同性のあるTango(Tgo)が知られている¹²⁾。この二つの因子は二量体を形成し、XRE配列に結合してその遺伝子を転写活性化する点は同じであるが、哺乳類のAhR-ARNTとは全く異なった機能を持ってい

る。*spineless*遺伝子は足や触角、感覚器の細胞などで発現しており、*spineless*の欠損したショウジョウバエは遠位の触角が足になり、足の末端が欠損し、体毛のサイズも短くなる。Tgoは常時細胞質に発現しており、Ssが発現すると二量体を形成して核に入り、XREに結合し転写を活性化するが、これはダイオキシンなどのリガンド非依存的な活性化機構による。

5. HIFによる体内酸素環境の調節

HIFにはHIF-1 α 、EPAS1(endothelial PAS domain protein 1; HIF-2 α), HIF-3 α の3つのbHLH-PAS型転写因子が知られており、これらの因子はARNT, ARNT2, BMAL1とヘテロ二量体を形成してエリスロポエチンやVEGFなどの低酸素によって誘導される遺伝子のエンハンサー領域にあるHRE(hypoxia response element; ACGTG)に結合し、これらの因子の発現を誘導する^{12,59)}。この反応は通常の酸素分圧ではHIFは急速に分解される性質があるが、体内が低酸素状態にあるとHIFの分解が弱まり、安定性が上昇し、その結果HIFが増加することによって主に起こっている。低酸素によって起こる反応はこのようにエリスロポエチン、VEGFの誘導、これらの結果おこる造血反応や血管内皮細胞の誘導による低酸素組織における毛細血管の増殖、低酸素性の呼吸に備えた解糖系の酵素や糖トランスポーターの誘導、胎盤の細胞栄養層細胞の増殖などがあるが、これらの反応にHIFの関与が示されている。またHIF-1 α は癌抑制因子p53と結合してその安定性を調節することによって細胞周期に関わっていることも最近明らかにされた⁵⁶⁾。*hif-1 α* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生期にまでしか生きられず、

神経系や心血管系の重度の異常がみられ、HIF-1 α の標的遺伝子発現の低下をきたすと報告されている³²⁾。*arnt*欠損マウスにも卵黄嚢や胎盤の血管欠損がみられ、HIF-1 α -ARNT二量体機能が失われた結果と考えられる。最近HIF-1 α の機能を調整する因子としてp35srjが同定された⁶⁾。HIF-1 α はコアクティベーターであるp300あるいはCBPと結合して転写活性化を起こすが、p300とCBPのHIF-1 α との相互作用部位であるシステインとヒスチジンに富んだ領域(CH1 region)にp35srjが結合し、HIF-1 α とこれらコアクティベーターとの結合を阻害するのである。低酸素状態ではp35srjは上昇するので、この因子はオフのスイッチとして働いている可能性がある。またCBPとHIF-1 α の結合を抑制することで、CBPが他の転写因子と結合できるよう調整しているのかもしれない。

6. bHLH-PAS型転写因子と発生

ショウジョウバエのSIMは神経系の発生段階において正中細胞に発現し、分化した段階でも正中の神経細胞とグリア細胞に発現する蛋白である。*sim*の欠損したショウジョウバエでは正中線の細胞分化が全く認められなくなり、典型的な細胞形態や分化した神経細胞、グリア細胞が形成されなくなる^{10,11)}。また*sim*をヒートショック誘導性のベクターを用いて異所性に発現させると、そこに正中線に発現している遺伝子が誘導されることが確かめられている⁴⁹⁾。SIMは主に核内に存在し、哺乳類のARNTと相同性の高いTgoとヘテロ二量体を形成してCME(CNS midline enhancer element; コア配列=ACGTG)に結合し、中枢神経系正中線において特異的な遺伝子の発現を誘導する。Tgoは全身

に発現していることから、この誘導はSIMの発現に依存していると考えられる。*sim*のプロモーターにはCMEがあり、*sim*の転写はSIM自身によって活性化される。

哺乳類のSIMはSIM1とSIM2の二種類が知られており、両者ともARNTとヘテロ二量体を形成し、ショウジョウバエSIM-Tgoヘテロ二量体と同様にCMEに結合する。ショウジョウバエの*sim*の発現は中枢神経系に限局されているが、哺乳類の*sim*は中枢神経系ばかりでなく中胚葉にも発現する^{9,19,45,71}。マウス胎生期においては、原節、鰓弓や肢節 (*sim2*)に発現がみられ、中枢神経系での発現は両者とも腹側間脳に認められ、*sim1*は中脳、脊髄での発現もみられる。成体では*sim1*は肺と腎臓、*sim2*は骨格筋と腎臓に主に発現している。*sim1*は視床下部にあるPVN(paraventricular nucleus)、aPV(naterior periventricular nucleus)、SON(supraoptic nucleus)の前駆細胞に発現しており、*sim1*欠損マウスではこれらの核で十分な神経細胞の分化が行われず、CRH(corticotropin-releasing hormone)、TRH(thyrotropin-releasing hormone)、バソプレッシン(vasopressin)、オキシトシン(oxytocin)、ソマトスタチン(somatostatin)などのペプチドホルモン産生がなくなってしまうことが確かめられている⁴²。*arnt2*欠損マウスでもPVNとSONで同様の低形成が起こっているため、*arnt2*が同部位で発現していること、ARNT2はSIM1と相互作用が認められること、ARNTは同部位ではあまり発現が見られないことなどから³³、SIM1はARNT2とともに、視床下部のこれらの核での神経系の分化とその特異的なペプチド発現を制御していることが示唆される^{43,70}。*sim2*はヒトの染色体21q22領域にある。この領域はダウン症の責任領域に含まれ、しかも*sim2*が頭骨、顔面、口蓋、脊椎な

どの原基に発現し、ダウン症と関連する部位でもあることから、ダウン症の原因遺伝子の一つではないかと考えられている^{15,19,54}。SIM1はARNTなどとヘテロ二量体を形成してCMEに結合して転写を活性化するが、反対にSIM2はARNTと結合して転写を抑制する方向に働くことが確かめられ、転写を活性化するという報告はない。またSIM2はこのような直接の抑制ばかりでなく、ARNT-HIF-1 α による転写活性化をARNTがHIF-1 α に結合することを阻害することによって間接的に抑制作用を発揮するという。またSIM1のARNTとの相互作用に対してもSIM2は阻害的に働くことが報告されている⁴⁶。ダウン症は21番染色体の一部の領域のトリソミーであるが、そのため、この領域にある遺伝子の発現増加が想定されている。*sim2*をトランスジェニックマウスによって過剰発現させると恐怖条件回避課題や水迷路による学習課題が中程度に阻害されたという¹⁶。

7. bHLH-PAS型転写因子と時計発振機構

今までに哺乳類から一番下等な生物としてアカパンカビ(*Neurospora Crassa*)まで、生体リズムの形成にPAS因子を用いていることが分かっている。それぞれの生物で構成因子の相違はあるものの、大きく分けてDNAに結合して転写を活性化させる促進系の因子と、促進系の因子に直接あるいは間接に作用して転写を抑制する抑制系の因子に大別できる。そして促進系の因子は抑制系の因子の転写を促進させ、産生された抑制因子によって促進因子自身は抑制され、その結果抑制因子の転写が抑制されるという負のフィードバックループを形成している^{14,26}。

*Neurospora*には時計機構に関連するPAS因子としてWC-1(White Collar-1)とWC-2の2つの因子が同定されている⁴¹⁾。これらの因子はPASドメイン以外にZincフィンガードメイン(Zinc finger domain)があり、PASドメインを介して二量体を形成し、転写因子として働いている。*Neurospora*には早くから時計変異体の存在が知られており、その本体は*frq*であることが分かっていたが、このWC-1-WC-2ヘテロ二量体は*frq*遺伝子に作用して、そのリズム発現に関与しているのではないかと考えられている。またFRQはWC-2に直接作用してその作用を抑制することで、負のフィードバックループを形成している。

ショウジョウバエの生体リズムはPERの発見が早かったこともあり、解明が一番進んでいる。ショウジョウバエの負のフィードバックループはPER、dCLOCK²⁾、CYCLE(dBMAL1)^{13,58)}の3つのPAS型転写因子によって構成され、そこにTIM(Timeless)、CRY(Cryptochrome)¹⁷⁾などが関係している²⁶⁾。PERは1980年代半ばにクローニングされたが、dCLOCK(dCLK)とCYCLE(CYC; dBMAL1)の発見は10年以上たった1998年である。PERは前述したようにPASドメインのみのPAS因子であり、dCLOCKとCYCLEはbHLH-PAS型転写因子である。dCLOCKとCYCLEはHLH-PASドメインを介して二量体を核内で形成し、*per*と*tim*のプロモーター領域にあるE-box(CACGTG)に結合し、その転写を活性化する¹³⁾。この活性化で産生されたmRNAはやや遅れて蛋白に翻訳されPERはTIMと結合して核内に移動し、dCLOCK-CYCLE二量体に作用してその転写活性を阻害するため、*per*の転写が抑制されることになり、負のフィードバックループが完成するわけである。PERとTIMがdCLOCK-CYCLE二量体の*per*

転写の活性化を抑制するメカニズムは、PERやTIMが直接この二量体形成を阻害するのでなく、三量体あるいは四量体を形成してDNAへの結合を阻害しているためであると考えられている⁴⁾。*Cycle*は24時間を通じてその発現に変動はないが、*dClock*は*per*と反対の位相でサーカディアンリズムを示す^{4,58)}。この現象の時計発振機構における役割とそのメカニズムはまだ分かっていないが、リズムを減衰することなく維持するために促進因子と抑制因子を全く反対の位相で積極的に活性化する機構が存在するのかも知れない。ショウジョウバエの光同調機構として、光によってTIMの分解が起こり、抑制系が解除されるものが知られている^{548,72)}、CRYの機能解析によってその分子機構と関連すると思われる現象が発見された。その機構にはCRYが光依存的にTIMあるいはPER-TIMに結合することが重要な役割を演じている。実際*in vitro*でCRYはTIMと相互作用することが確かめられているが、CLOCK-CYCLEによって*tim*遺伝子は転写活性化され、PER-TIMを加えることでこの反応は抑制されるが、さらにここにCRYを加えることでこの抑制が完全に解除されるという。しかもこの反応は光存在下でしか起こらないという⁷⁾。

哺乳類の時計遺伝子の構成はショウジョウバエと殆ど同じであるが、詳しく見るとPERが3種類あることなどだけでなく、それぞれの役割が微妙に異なっていることが分かる⁶⁹⁾。*Clock*はENUによる変異マウスの中から約28時間周期を示す個体からポジショナルクローニングによって得られた遺伝子で、生物時計と関連するbHLH-PAS型転写因子としては、初めてのものであった³⁴⁾。その後*Per1*がショウジョウバエとのホモロジーを利用してクロ

ーニングされ⁶⁴⁾、また *Bmal1* が SCN (視交叉上核) に発現し、夜間にピークのあるサーカディアンリズムを示すこと²⁹⁾、CLOCK とヘテロ二量体を形成し、*Per* 遺伝子のプロモーター領域にある E-box (CACGTG) に結合してその転写を活性化することなどが明らかになり²¹⁾、哺乳類の生物時計を司る因子が一気に出そろうことになった^{31,44,60,63)}。CLOCK-BMAL1 は促進因子として *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* などの抑制系の因子の転写を促進し、産生されたこれらの因子が CLOCK-BMAL1 を介して自身の転写を抑制する機構はシヨウジョウバエと全く同じである^{14,37)}。しかし CLOCK-BMAL1 と抑制因子の作用様式は抑制因子間で異なることが一部分かっ
てきている。CRY は直接 BMAL1 と作用して転写抑制作用を及ぼしていると考えられるが、PER, TIM は CLOCK-BMAL1 と *in vitro* での結合は認められず、CLOCK-BMAL1 と直接には相互作用していないようである。また CRY1,2 の CLOCK-BMAL1 を介した転写活性化抑制能は、抑制因子の中では一番強いことが分かっており、BMAL1 と直接作用することと関係している可能性がある。*Cry1* あるいは *Cry2* のノックアウトマウスは周期がそれぞれ短くなるあるいは長くなる現象が観察されており^{25,65)}、これらの遺伝子のダブルノックアウトでは行動リズムが消失している⁶⁶⁾。このことからマウスの CRY1 および CRY2 は時計発振機構のなかで重要な構成因子であると考えられる。

哺乳類の光同調を担う因子はまだ見つからない。前述のようにシヨウジョウバエでは CRY が光受容と光同調を行う因子であることが証明されたが、哺乳類の CRY1、CRY2 にはそのような作用がないことが確かめられている。*Per1* や *Per2* は、

暗期に光照射するとその mRNA が誘導されることが知られているが^{3,61)}、*Cry1* と *Cry2* の両者を欠損したマウスに同様の処置をしても mRNA の誘導性は全く変わらなかったからである⁵¹⁾。

哺乳類の時計遺伝子もシヨウジョウバエと同様に抑制因子と促進因子の発現位相が正反対になる現象が見つかっている。シヨウジョウバエの場合、リズム発現するのは *Clock* であるが^{5,23,38)}、哺乳類では *Bmal1* がオシレーションする^{1,29)}。SCN では暗期の前半に *Bmal1* の発現がピークになり、おそらく引き続いて蛋白の産生がピークを迎え、増加した CLOCK-BMAL1 が暗期の後半から *Per1* の転写を活性化するため、明期の前半に *Per1* の発現がピークを迎えるものと考えられる。その後産生された PER1 などの抑制因子は明期の後半にかけて自身の転写を抑制することになる。この時なんらかのメカニズムで BMAL1 の発現抑制を PER1 などの抑制因子が解除するメカニズムが存在する可能性がある。すなわち抑制因子が負のフィードバックで自身を負に制御するだけではなく、促進因子を正の方向に制御していると考えられる。また反対に BMAL1 は自身の転写を抑制し、反対に抑制因子を増加させる方向に働くのである。このメカニズムが実際に機能しているかは今後の研究の展開を待たなければならないが、SCN に限らず肝臓などの末梢組織においても *Per1* と *Bmal1* の発現が正反対の位相を示すことから時計発振機構に重要な現象と思われる。(図4)

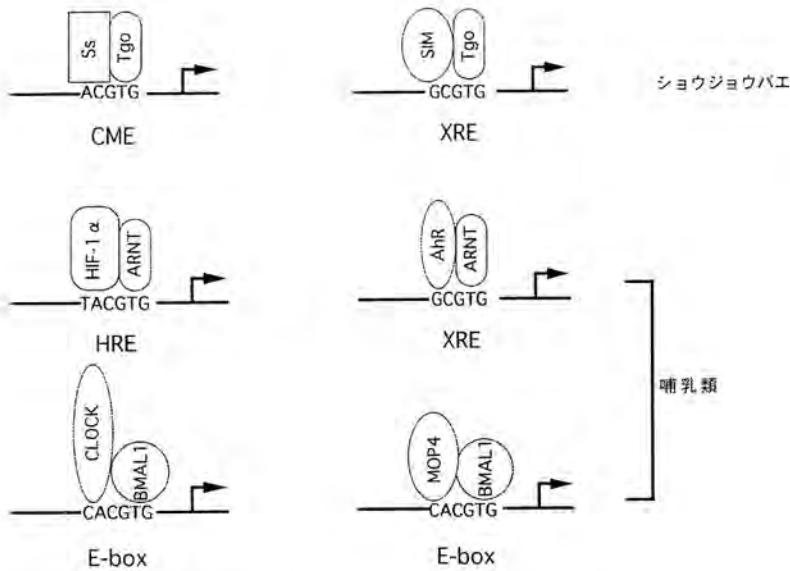


図4 bHLH-PAS型転写因子のDNA結合配列

ショウジョウバエのCMEとXRE, 哺乳類のHRE,XRE, E-boxを示した。bHLH-PAS型転写因子の二量体は標的遺伝子のプロモーターにあるそれぞれの配列に塩基性領域を介して結合し、標的遺伝子の転写調節をする。CLOCK-BMAL1は*per1*とバゾプレッシンのプロモーター領域にあるE-boxに結合し*per1*、*vasopressin*それぞれの転写を活性化する。MOP4(NPAS2)はBMAL1とヘテロ二量体を形成しバゾプレッシンプロモーター領域にあるE-boxに結合して転写活性化する。図中に示した配列はコア配列。

Ss:Spineless, Tgo:Tango

参考文献

1) Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M, Yu W, Honma K: Brain Res Mol Brain Res.66:104-110 (1999)	8) Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC: J Biol Chem. 274:10113-10118 (1999)
2) Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC: Cell, 91:1055-1064 (1997)	9) Chrast R, Scott HS, Chen H, Kudoh J, Rossier C, Minoshima S, Wang Y, Shimizu N: Genome Res. 7:615-624 (1997)
3) Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M: Cell, 93:791-804 (1998)	10) Crews ST, Thomas JB, Goodman CS: Cell, 15:52:143-151 (1988)
4) Bae K, Lee C, Hardin PE, Edery I: J Neurosci. 20:1746-1753 (2000)	11) Crews ST: Genes Dev. 12:607-620 (1998)
5) Bargiello TA, Jackson FR, Young MW: Nature, 312:752-754 (1984)	12) Crews ST, Fan CM: Curr Opin Genet Dev.9:580-587 (1999)
6) Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM: Genes, 13:64-75 (1999)	13) Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TDL, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA: Science, 280:1599-1603 (1998)
7) Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA: Science, 285:553-556 (1999)	

- 14) Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK: *Genes Cells*, 4:1-10 (1999)
- 15) Ema M, Morita M, Ikawa S, Tanaka M, Matsuda Y, Gotoh O, Saijoh Y, Fujii H, Hamada H, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y: *Mol Cell Biol*. 16:5865-5875 (1996)
- 16) Ema M, Ikegami S, Hosoya T, Mimura J, Ohtani H, Nakao K, Inokuchi K, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y: *Hum Mol Genet*. 8:1409-1415 (1999)
- 17) Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M: *Cell*, 95:669-679 (1998)
- 18) Emmons RB, Duncan D, Estes PA, Kiefel P, Mosher JT, Sonnenfeld M, Ward MP, Duncan I, Crews ST: *Development*, 126:3937-3945 (1999)
- 19) Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M: *Mol Cell Neurosci* 7:1-16 (1996)
- 20) Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Chen g JB: *Biochem Biophys Res Commun*. 246:570-577 (1998)
- 21) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ *Science*, 280:1564-1569 (1998)
- 22) Genick UK, Soltis SM, Kuhn P, Canestrelli IL, Getzoff ED: *Nature*, 392:206-209 (1998)
- 23) Glossop NR, Lyons LC, Hardin PE: *Science*, 286:766-768 (1999)
- 24) Gong W, Hao B, Mansy SS, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Chan MK: *Proc Natl Acad Sci U S A* , 95:15177-15182 (1998)
- 25) Griffin EA Jr, Staknis D, Weitz CJ: *Science*, 286:768-771 (1999)
- 26) Hardin PE: *Curr Opin Neurobiol*. 8:642-647 (1998)
- 27) Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y : *Mol Cell Biol*. 16:1706-1713 (1996)
- 28) Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O: *Science*, 252:954-958 (1991)
- 29) Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M: *Biochem Biophys Res Commun*. 250:83-87 (1998)
- 30) Huang ZJ, Edery I, Rosbash M: *Nature*, 364:259-262 (1993)
- 31) Ikeda M, Nomura M: *Biochem Biophys Res Commun*. 233:258-264 (1997)
- 32) Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL: *Genes Dev*. 12:149-162 (1998)
- 33) Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA: *Mech Dev*. 73:117-123 (1998)
- 34) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS: *Cell*, 89:641-653 (1997)
- 35) Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: *J Biochem (Tokyo)*, 122:703-710 (1997)
- 36) Konopka RJ, Benzer S : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68:2112-2116 (1971)
- 37) Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM: *Cell*, 98:193-205 (1999)

- 38) Lee C, Bae K, Edery I : *Neuron*, 21:857-867 (1998)
- 39) Leo C, Chen JD: *Gene*, 245:1-11 (2000)
- 40) Long WP, Chen X, Perdew GH: *J Biol Chem*. 274:12391-12400 (1999)
- 41) Loros JJ : *Curr Opin Microbiol*. 1:698706 (1998)
- 42) Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM: *Genes Dev*.12:3264-3275 (1998)
- 43) Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan C:*Mech Dev*.90:253-261 (2000)
- 44) Miyamoto Y, Sancar A:*Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:6097-102 (1998)
- 45) Moffett P, Dayo M, Reece M, McCormick MK, Pelletier J:*Genomics*,35:144-155 (1996)
- 46) Moffett P, Pelletier J : *FEBS Lett*. 466:80-86 (2000)
- 47) Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M,Mackinnon R : *Cell*,95:649-655 (1998)
- 48) Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW: *Science*,271:1736-1740 (1996)
- 49) Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, Crews ST: *Cell*,67:1157-1167 (1991)
- 50) Ni M, Tepperman JM, Quail PH:*Cell*, 95:657-667 (1998)
- 51) Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A,Muijtjens M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT: *Science*,286:2531-2534 (1999)
- 52) Pellequer JL, Wager-Smith KA, Kay SA, Getzoff ED: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:5884-5890 (1998)
- 53) Ponting CP, Aravind L: *Curr Biol*. 7:R674-677 (1997)
- 54) Probst MR, Fan CM, Tessier-Lavigne M, Hankinson O :*J BiolChem*. 272:4451-4457 (1997)
- 55) Pugh CW, O' Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ: *J Biol Chem*.272:11205-11214 (1997)
- 56) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D,Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A :*Genes Dev*.14:34-44 (2000)
- 57) Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C,Hall JC, Rosbash M : *Cell*,38:701-710 (1984)
- 58) Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC: *Cell*,93:805-814 (1998)
- 59) Semenza GL: *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:551-578 (1999)
- 60) Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr,Reppert SM : *Neuron*, 19:1261-1269 (1997)
- 61) Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, TeiH, Moriya T, Shibata S,Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H :*Cell*,91:1043-1053 (1997)
- 62) Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: *J Biochem (Tokyo)* ,122:1075-1079 (1997)
- 63) Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K,Maebayashi Y, Sakakida Y,Okumura K, Takashima N, OkamuraH: *Genes Cells*, 3:167-176 (1998)
- 64) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R,Hirose M, Sakaki Y: *Nature*, 389:512-516 (1997)
- 65) Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, Kazantsev A, HsuDS, Petit C, Selby CP, Dawut L,Smithies O, Takahashi JS, SancarA :*Science*, 282:1490-1494 (1998)
- 66) van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R,Kanno S, Takao

- M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A : *Nature*, 398:627-630 (1999)
- 67) Wang F, Hoivik D, Pollenz R, Safe S : *Nucleic Acids Res.*26:3044-3052 (1998)
- 68) Whitlock JP Jr: *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:103-125 (1999)
- 69) Whitmore D, Sassone-Corsi P, Foulkes NS: *Curr Opin Neurobiol.* 8:635-41 (1998)
- 70) Wines ME, Tiffany AM, Holdener BC: *Genomics*, 51:223-232 (1998)
- 71) Yamaki A, Noda S, Kudoh J, Shindoh N, Maeda H, Minoshima S, Kawasaki K, Shimizu Y, Shimizu N: *Genomics*, 35:136-143 (1996)
- 72) Zeng H, Qian Z, Myers MP, Rosbash M: *Nature*, 380:129-135 (1996)

北海道大学医学研究科・統合生理学講座・ 時間生物学分野（旧医学部生理学第一講座）

本間 研一

大学院重点化で講座の名称が変わりました。旧生理学第一講座と第二講座が統合されて統合生理学講座となり、旧第一講座の通称（文部省には登録されていない）が時間生物学分野（教室）となりました。英文名称は従来通りです。旧第一講座は、先代の廣重 力教授の頃から、本間研一（現教授）、本間さと（現助教授）の両名を中心に、「生物リズム」を主たる研究テーマとして来ました。廣重前教授、本間現教授はそれぞれ、時間生物学会の前身である「生物リズム研究会」および「臨床時間生物学研究会」の創設者の1人です。現在の研究メンバーは、教官として本間研一教授、本間さと助教授、安倍博講師、勝野由美子助手、遠藤拓郎助手の5名、学術振興会特別研究員の橋本聡子、大学院生として棚橋祐典（D4）、石崎高司（D4）、増淵 悟（D3）、波平昌一（D3）、山崎綾野（D2）、中村渉（D2）、太田英伸（D1）、角田美保子（D1）、宮崎俊彦（研究生）、米山重人（研究生）の15名です。このうち、大学院生の中村と角田はそれぞれ北大歯学研究科、筑波大医学研究科から武者修行に来た強者です。研究メンバーの学問背景や出身地はバラエティーに富んでおり、地元の北大医学部出身者は教授、助教授を含め4名、他大学の医学部出身者

は4名、他学部出身者は7名です。この他に、技官の安田 円が研究に加わっています。平成12年3月には棚橋、石崎両院生が無事卒業する予定で、また4月には勝野助手が栄転します。

教室のシンボルテーマは「時を刻む脳」。全員なんらかの形で生物リズムの研究に関わっています。現在は、「ヒト」を対象とした研究、「動物の行動」を対象とした研究、「培養細胞」を対象とした研究、「時計遺伝子」を対象とした研究の4つの研究が進行中ですが、オーバーラップや相互乗り入れが多く、誰がどのグループに属しているかは判然としません。

「ヒト」の研究は、何と言っても本間研一教授が、17年前に私財を投じて建てた時間隔離実験室を用いたヒトのフリーラン実験が有名で、教授の直接の指導のもと、遠藤、橋本、角田がそれぞれ睡眠脳波、メラトニンリズム、自律神経機能の解析に取り組んでいます。最近の研究成果で主たるものは、ヒトではメラトニンリズムと睡眠覚醒リズムの同調因子が異なり、前者が高照度光、後者は社会的スケジュールなどの非光因子であることを実験的に証明したことです（橋本）。現在は、2振動体からなるヒト体内時計の機能的構造を解明する基礎的研究の他に、異なる作用をもつ同調因子を巧みに

組み合わせ、時差飛行、交替勤務、閉鎖環境下における生体リズムの維持など応用的研究もおこなっています。

「培養細胞」の研究は、本間さと助教授が松下電工と共同で開発実用化した培養ニューロン活動の長期連続測定法とペプチド分泌測定などを駆使し、ラットやマウスの視交叉上核ニューロンで時計機能の解析をおこなっています。このグループには勝野、中村そして共同研究者として北大歯学研究科の白川哲夫講師が加わっています。最近の研究成果としては、ラットにおいて個々の視交叉上核ニューロンが示すフリーラン周期の分布が個体のフリーラン周期の分布よりはるかに広いことを明らかにし、視交叉上核内に多数の振動ニューロンの機能を統合するメカニズムがあることを示唆したことです(本間)。現在は、シナプスによる振動ニューロン間の同調(白川)やAVP、VIPニューロンとの関係(勝野、中村)、時計遺伝子の役割などを解析しています。4月には新しい培養室が完成し、多電極デッシュも40チャンネルまで増設して実験も佳境に入ったところです。

「動物の行動」を対象とした研究は古典的ですが、遺伝子変異動物が溢れ出てくる昨今、リズムマーカーとしてだけでなく、主振動体・従属振動体関係を明らかにする重要な研究分野として位置づけています。このグループには安倍、遠藤、石崎、増測がいます。各種アクトグラフ、テレメトリー脳波計などを駆使して行動リズムを解析しています。4月には新しい動物観察室が完成し、行動リズム測定装置も300チャンネルを越す予定です。最近の成果としては、活動期が分離するCSマウスのPRC解析で、それぞれに光反応性が異なる振動体が関与している

ことを示したこと(安倍)、覚醒剤であるメタンフェタミン慢性投与ラットの脳波解析と時計遺伝子解析で行動を直接支配する振動体の特性が明らかになったこと(遠藤、増測)、周期的制限給餌ラットにおける給餌前コルチコステロンピークの形成に脳幹のNPYニューロンが関与していること(石崎)、などを挙げるができます。

「時計遺伝子」を対象とした研究はここ1~2年の間に大きく進展しました。この研究グループには、本間教授、助教授の他、棚橋、波平、太田、そして学外から共同研究者として静岡大学教育学部の近江谷克裕助教授、埼玉医科大学の池田正明講師が参加しています。競争の激しい分野だけにアイデア勝負、最後に笑うのは誰かと皆必死です。最近の成果としては、網膜における時計遺伝子の発現リズムや光反応性は視交叉上核とは異なることを示し、網膜振動体ではリズム発振を演じている役者が異なる可能性を示したこと(波平)や生物発光レポーターを用いてGH遺伝子の転写活性を連続的に測定する新しい技術を開発したこと(棚橋)を挙げるができます。この他、新しい研究グループとのプロジェクトが幾つか開始され、近い将来それらの成果を学会等でお知らせ出来ると思います。

最後に教室の歳時記。一週間は月曜日午前8時30分からの集談会で始まります。先々代の伊藤真次教授から続く教室の伝統行事で、毎回誰かが担当して最新の文献を1~2編詳細に紹介します。担当者が著者の代りに十数名のレフリーに対し必死に防戦します。大学院生はここで発表と議論の要領を学びます。引き続き教室会議、そして全員による教室小掃

除。午後からは教授と大学院生との輪読会があります。4月からは、時間生物学の古典で聖書でもあるピッテンドリー・ダーンの「A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. J.Comp.Physiol.,1978」4編を読むことになっています。このテキストによる輪読会はほぼ3年ごとに繰り替えされ、院生によっては2回目の人もあります。毎週土曜の午後は、教授よる大学院生の個別面接授業。一週間の実験内容や成果の検討、次の一週間の実験計画などの指導があります。月の第一金曜日は、午前を費やしてデータ検討を全員でおこないます。助教教授以下、毎回2名づつ半年分の研究成果を発表し、相互批評を行います。大学院生は、ここでデータの読み方、解析の仕方、まとめ方を学びます。月に1度の嬉しい行事（嬉しくない人もいる）は「お誕生会」。教授秘書さんが用意するバ

ースデーケーキに舌づつみを打ちます。年中行事は、春の「花見とジンギツカン」、夏の「野球大会と生ビール」、秋の「観楓会と温泉たまご」、冬の「雪祭りセミナーと八角の姿焼き」。写真は1998年の観楓会で、大雪山に1泊2日で出かけたときのものです。忘れてならないのが「生物リズムに関する札幌シンポジウム」。隔年の行事で、夏に開催されます。この教室主宰の国際シンポジウムは1984年から続けられ、昨年は第8回を文部省国際シンポジウムと共催で行いました。大学院生はここで英語による発表や討論の方法を学び、世界の第一線で活躍している研究者に直接して留学のチャンスを狙います。そろそろ制限字数となりました。さらに詳しい研究内容や業績を知りたい方はホームページをご覧ください。

(<http://babu.med.hokudai.ac.jp/~phys-1w/>)



写真タイトルと説明 大雪山旭岳に挑む。

1998年の教室観楓会で秀峰旭岳（2290m）登頂を試みる。前日は天人峡温泉で氣勢をあげる。

第6回日本時間生物学会学術大会報告

大会会長 塚原保夫

第6回日本時間生物学会学術大会が、東北大学・大学院情報学研究科・塚原保夫教授を大会会長とし、平成11年18日から19日仙台市福祉プラザを会場に開催された。「循環器系の時間医学」と「光受容分子と親時計の分子機構」と銘打ったシンポジウム2題、および44題の口演、32題のポスター発表が行われ、引き続き「市民公開講演会：眠れぬ夜のために」が開催された。シンポジストを含めた発表者

総数が91名におよび、当日参加者を含め212名の参加者があり、活発な質疑応答が繰り広げられた。市民公開講演会には70名の聴衆が集まり興味ある講演に熱心に耳を傾けた。また、本大会において学会に多大な貢献をされた千葉喜彦氏に対し、名誉学会員の授与が行われた。晩秋の仙台での開催であったが、幸い天候にも恵まれ盛況の内に終わることができた。

第7回日本時間生物学会の御案内

大会会長

大塚邦明

(東京女子医科大学)

日時：2000年11月9日（木）、10日（金）

場所：東京都市ヶ谷の「アルカディア市ヶ谷」

シンポジウム

「無拘束長時間モニタリングの進歩」

「視交叉上核の最近の話題（仮題）」

特別講演

「エコロジーの世界と医学」

ランチョンセミナー

「生命現象のゆらぎと複雑性」

「睡眠モニタリングとテレメディスン」

サテライトシンポジウム

第1回「太陽・地球・生態系
と時間治療研究会 Workshop

on Chronoastrobiology and
Chronotherapy」

日時：2000年11月11日（土）

場所：東京都市ヶ谷の「アルカディア市ヶ谷」

執筆要領

原稿は、ワードプロセッサまたはコンピュータソフトを用いて作成する。プリントアウトした原稿1部(図表を含む)とフロッピーディスクを編集局へ送付する。フロッピーディスクのフォーマット、使用したマイコンの機種、ワープロソフトは一般に使われているものなら何でも結構ですが、使用したマイコンの機種、ワープロソフト、氏名及びタイトル名をフロッピーディスクの上に明記して下さい。なお、念のため、テキスト形式で保存したファイルも添付するようにして下さい。

総説と技術ノートの著作には、別刷り50部を無料でさしあげます。50部以上希望の場合は有料となりますので、編集局までその旨連絡して下さい。また、非会員で総説または技術ノートを執筆いただいた場合、会費免除で1年間本学会会員になれます。

1. 総説と技術ノート

- 1) 原稿の長さは、図、表、文献を含め刷り上がりで8ページ程度(1頁は約1400字と考えて下さい: 横1行18文字で1頁39行×2=78行)とする。
- 2) 第1頁に表題、著者名、所属及びその所在地、電話番号、FAX番号、E-mailアドレス及び脚注(必要がある場合)を記す。
- 3) 第2頁に400字程度のアブストラクトを記入する。
- 4) 本文に節を設ける場合、1、2、3、・・・とする。
- 5) 書体の指定は、プリントアウトした原稿に朱で行い、斜体(イタリック体)は1本下線(____)、太字体(ゴシック体)は波下線(~~~~)とする。
- 6) 参考文献の数は特に制限しないが、50編以内が望ましい。参考文献は、アルファベット順に通し番号を付けて文末にまとめて掲げる。本文中の引用箇所には、通し番号を右肩に付けて示す。
(例) Aschoffによると¹⁻³⁾、・・・である^{5, 8, 9)}。
- 7) 文末の参考文献の記載は、次のようにする。
[雑誌] 通し番号) 著者名: 誌名、巻数、ページ(発行年)
[書籍] 通し番号) 著者名: 書名、ページ、発行所(発行年)
(例) 1) Aschoff J, Gerecht U, Wever R: Jpn J Physiol. 17:450-457 (1967)
2) Aschoff J: Circadian Clocks, pp 95-111, North-Holland, Amsterdam (1965)
- 8) 表は原則として3~5程度とするが、必要に応じて増やすことができる。簡潔な標題と必要な説明をつけて、本文とは別の用紙で作成する。
- 9) 図は原則として3~5程度とするが、必要に応じて増やすことができる。1枚の刷り上がりの大きさは、14cm(横)×10cm(縦)か、7cm(横)×10cm(縦)となるようにする。図には簡単な標題を付ける。図の標題と説明は別紙にまとめる。
- 10) 図及び表の表示は、図1、図2、・・・、表1、表2、・・・の通し番号で行う。これらを挿入する箇所を、プリントアウトした本文の原稿欄外にエンピツ書きで指示する。
- 11) 図及び表を文献から引用した場合は、引用を明記するとともに、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可をとっておく。

2. 研究グループ

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

3. 海外レポート

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

4. 関連集会報告

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

編集後記

◆懸案事項の編集委員会が以下のメンバーで構成されました。本誌は編集委員会による企画第一号として、富岡先生が中心となって「生物時計関連遺伝子」を特集したものです。これとは別に、時間生物学研究に役立つ研究手法を解説するために技術ノートも企画しました。それぞれ内容のある総説で参考になるものばかりです。大いに活用して頂きたいと思います。

編集委員会

海老原史樹文（委員長、名古屋大学生命農学研究科）、安倍博（北海道大学医学研究科）、内山真（国立精神・神経センター）、大塚邦明（東京女子医科大学）、富岡憲治（山口大学理学部）

◆SRBRの会議に参加してきました。時計遺伝子を中心とした分子生物学的研究の発表が圧倒的に多く、リズム発振機構の全貌が明らかになるのも近いと感じました。この分野での日本人の貢献度は高く、それを反映して日本からの参加者は今までになく多く、特に若い人の参加が目立ちました。ここしばらくは時計の分子機構解明に向けた研究が猛スピードで進むと思われませんが、その後の方向性を考える時期に来ているように感じました。

◆本誌へ投稿を希望される方は編集局までご一報ください。時間生物学に関連する記事を受け付けています。

日本時間生物学会会誌 Vol.6, No.1 (2000) 平成12年5月発行

発行:日本時間生物学会

(事務局) 〒464-8602 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院理学研究科 生命理学専攻内
TEL:052-789-2498/FAX:052-789-2963

(編集局) 〒464-8601 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻内
TEL&FAX:052-789-4066