

目次

巻頭言	1
井深 信男	
特集：「生物リズムの理論的基礎と多様性」について	3
岩崎 秀雄・吉村 崇	
1. シアノバクテリアの概日リズムの発振機構モデルの新たな展開	5
岩崎 秀雄	
2. キイロショウジョウバエ <i>per⁰¹</i> 系統における概日歩行リズムの温度依存的発現	11
松本 顕	
3. ショウジョウバエ概日時計のゲノムワイドな発現解析	16
上田 泰己	
4. 哺乳類の新しい光同調モデル	22
重吉康史・藤岡厚子・長野護・中浜健一	
5. 体節形成における周期パターンの調節 — 振動子がつくる空間パターン —	28
尾崎 淳・平田 昌・近藤 滋	
6. To be oscillatory or stationary, that is a question	32
中垣 俊之	
7. ウズラの排卵・放卵周期の制御機構	38
吉村 崇	
呼吸器領域における時間医学	42
鱈岡直人・高田美也子・清水英治	
生物時計の固有周期の分布 — 概日時計の周期はなぜ概日か —	52
大同 寛明	
関連集会報告	
国際時間生物学会第25回学術会議に出席して	61
原田 哲夫	
海外レポート	
コロンビア大学：Dr. Rae Silver 研究室	65
浜田 俊幸	
第8回日本時間生物学会山口大会の報告	71
井上 慎一	
第1回時間生物学世界大会	73
Constitution for a World Federation of Societies for Chronobiology	75
日本時間生物学会次期理事の打ち合わせ記録	78
日本時間生物学会11回理事会議事	79
2001年度会計中間報告	81
2002年度予算案	82
特許法の新規性にかかわる例外規定適用の指定について	82
賛助会員リスト	83
第9回日本時間生物学会学術大会	83
執筆者のプロフィール	84
執筆要領	86

巻 頭 言

理系学問と文系学問のはざままで

—文理融合ということ—

井深 信男

滋賀大学教育学部 心理学教室

時間生物学会が成立してから早8年が経ち、学会もまずは順調に成長しているといえるだろう。私は学会の前身の生物リズム研究会と臨床時間生物学研究会の二つに関係していたので、かれこれ、20数年生物リズム研究に携わっている。何をしなくとも時間だけは経つもので、少年老い易く学成り難し、をまさに実感している。

この学会は医学、理学、農学、工学など多分野の領域から構成されているのが特徴である。心理学、行動科学関係の研究者は「その他」に分類されている。心理学は領域が広く、また、研究対象により方法論が著しく異なる。全く純粋に自然科学の方法論に依拠した実験系分野がある一方、調査、インタビュー、質問紙、テスト法、などを駆使する社会科学的な領域があり、最近では特に臨床心理に人気がある。私は自分の専門を答えるときに、最近では生物的心理学「biological psychology」と答えることが多いのだが、日本では定着した名称とは言えない。伝統的な知覚や認知心理学を含めても、実験系心理学は数では圧倒的に少数派である。また、実験系心理学者自身も純粋自然科学手法を用いていたとしても、自分が百パーセント自然科学者であると意識

しているひとは、むしろ稀なのではないだろうか。このあたりが、心理学の最大の特徴でもあり、鵠的存在と言われるところかも知れない。また、心理学者の多くは行動に関心があるので、行動発現に関わるマクロレベルでの要因の分析が得意であるが、一見すると現象の記述に留まっている、と理解されるかも知れない。また教育体制から見ると、心理学は文理融合型の学問ともいえるだろう。

かつて在外研究で1年過ごしたUC Berkeleyの心理学教室のZucker教授はカナダ生まれの心理学者である。彼が最初に提唱した視交叉上核は今では概日時計として確立した。その一門からRusak, Stephan, Smaleなどが出ており、リズム研究に貢献している。彼らのやり方に共通しているのは現象を生理学や生化学に還元しても、還元主義には陥らないことである。近代心理学は心を理解するにあたって、行動を要素に還元することにより、多大の成果を修めてきた。しかし、要素に還元したとき全体を見失った、との反省も重要である。たとえて言うならば、水は化学的には酸素と水素より出来ていることは、真実なのだが、水は気体に還元された時、液体というその本来の特質を失ってしまった、とも言える。

平成3年に大学設置基準の大綱化により、大学教育において一般教育と専門教育の区別は廃止され、一般教育は一時衰退したかに見えたが、ここ数年再び教養教育の充実が大学教育で声高に叫ばれ、どこの大学でも教養教育の改革に熱心である。その一つに文理融合型の教育がある。これは理系教育に特徴的な技術教育、即物教育、実践教育だけでは感受性の強い、多感な大学の時期の人間形成の教育に充分でなく、人文的教養、社会的な関心と見方、が必要なことを主張するものであり、大賛成である。

なぜこのこのようなことを出したかという、リズム研究にも同じようなセンスが必要だ、と感じるからに他ならない。分子レベルで説明された行動を自然に帰し、意味づける作業を忘れてはならない、と思う。

特集：「生物リズムの理論的基礎と多様性」について

岩崎 秀雄

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

吉村 崇

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

昨年、の時間生物学会山口大会では、従来のシンポジウムに加え、比較的若手の研究者を主体とするワークショップの枠が提供され、上にあげた表題のワークショップを企画させていただきました。ワークショップでは、モデリングやシミュレーションを用いた理論的な仕事と、分子・細胞レベルの概日リズムの実験的検証の両輪を有機的に繋ぐ試みに焦点を当てました。本来、理論的アプローチと実験的アプローチは、概日リズム研究の黎明期以来の重要な研究の両輪であり、実際に概日リズム分野の確立に大きな貢献をしてきました。しかしながら、現在では分子レベルの研究が大きく進展し、概日リズム制御の新たな課題やその研究上の問題点も明らかになりつつあります。そこでは新たに、現状の分子レベル・細胞レベルの研究の展開に見合うだけの理論的な洞察や解釈体系が必要になってくると思われま

す。そこで、理論的な仕事と実験的な仕事の双方に通じた研究者に話題を提供していただき、より豊かな生物リズム研究を展開させていくための一助となればと考えてわけです。このため、概日リズムを中心としつつも、その他の時間現象・生体振動現象における最新の興味深い話題も積極的にとりあげたいと考えました。当日の講演内容は次の通りです。

岩崎秀雄（名大・理、科技园）

「シアノバクテリアにおける *kai* 時計遺伝子作用モデルの再検討」

松本 顕（九大・大教センター）

「キイロショウジョウバエ *per* 系統における概日歩行リズムの温度依存的発現」

上田泰己（東大・医、山之内製薬）

「概日時計の同調機構の解明に向けた 3 次元多細胞確率シミュレーションとゲノムワイドな発現解析」

重吉康史（近畿大・医）

「視交叉上核における同調と脱同調：多振動体が生み出す様々な姿」

尾崎淳・近藤滋（徳島大・総合科学、遺伝研）

「体節形成における周期パターンの調節」

中垣俊之（北大・電子研）

「粘菌変形体の細胞リズムの生理」

それぞれに斬新なアイデアに基づく興味深いデータやモデルが次々と紹介され、私たち世話人の期待を遙かに上回る中身の濃い講演が続き、講演者の方々には心より感謝申し上げます。今回の講演で、理論的な考察の重要性や面白味、そ

れと巧妙な実験とが一体となったときに立ち上る興奮などを、改めて肌で感じていただいた方もいらっしゃるのではないのでしょうか。その反面、井上大会委員長に無理にお願いして時間をたっぷりとらせていただいたはずだったのですが、世話人の不手際で質疑に十分な時間を当てることが出来ず、参加して頂いた皆様にご迷惑をおかけしてしまいました。申し訳ありません。世話人の一人（吉村）も講演を予定しておりましたが、時間的な都合で割愛しました（本特集号には入れさせて頂きました）。

多々不手際はありましたが、幸いワークショップ自体はおおむねご好評をいただき、この機会にご講演頂いた方々に改めて総説を寄せていただくことになりました。生物リズム研究の基盤と多様性について、また今後のリズム研究の展開について改めて考える際の参考にしていたければ幸いです。

シアノバクテリアの概日リズムの 発振機構モデルの新たな展開

岩崎 秀雄

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 日本科学技術事業団 (JST CREST)

シアノバクテリアは、概日リズムの知られる最も単純な生物であり、概日システムの基本的メカニズムを生理学的あるいは分子遺伝学的に解析する上で好個の材料である¹⁾。シアノバクテリアの概日リズム制御の中核と考えられる *kaiABC* 遺伝子群の作用機構として、KaiC による *kaiBC* オペロンの自己抑制ループ・モデルが提案されている。このモデルの妥当性を検討する中で、おぼろげながらユニークな概日制御機構の可能性が浮かび上がってきた。

1. *kai* 遺伝子群による単純フィードバック・ループ・モデル

kaiA, *kaiB*, *kaiC* の三つからなる *kai* 遺伝子群は、生物発光レポーターを利用した多数のリズム変異株の原因遺伝子群として、石浦・杳名・近藤らによって同定された²⁾。各遺伝子を破壊すると概日リズムは観察されなくなり、時計の必須因子と考えられる。またアミノ酸残基の置換により、極めて多様なリズム異常を誘導することからも、これらの遺伝子が時計制御の本質に関わることは明らかである。

kaiB と *kaiC* はオペロンを構成して共転写されるのに対し、*kaiA* は単独で発現する²⁾。*kaiA* mRNA, *kaiBC* mRNA は、ともに連続明8時間目 (LL 8) あたりをピークとする概日発現を示す。*kaiBC* の転写は、*kaiA* 遺伝子破壊株で抑制され、*kaiA* 過剰発現株では逆に促進されて無周期化する。このことから KaiA は *kaiBC* 発現活性化因子と考えられる。い

っぼう、*kaiBC* 発現は *kaiC* 遺伝子の構成的過剰発現により強く抑制されることから、KaiC は *kaiBC* 発現抑制因子と考えられた²⁾。KaiB と KaiC は mRNA リズムに数時間遅れて、LL15-16 をピークとする概日蓄積リズムを示す³⁾。また、KaiC の一過的な過剰発現誘導は、時刻依存的な位相シフトをもたらす^{2,3)}。

これらの知見は、ショウジョウバエの *period* (*per*) やアカパンカビの *frequency* (*frq*) の作用機構モデルとして90年代前半に提案されたモデルによく符合する⁴⁾。つまり、特定の時計関連抑制因子 (PER, FRQ, KaiC) の遺伝子発現が自分自身によって抑制されるのに対し、活性化因子 (dCLK::CYC, WC-1::WC-2, KaiA) によって促進される。抑制因子の転写が誘導されてから、自身の発現抑制に至るまでに適当なタイムラグが措置されることにより、正負調節のシーソーバランスが保たれ、抑制因子の転写が約24時間周期で振動するというわけだ。

抑制型の時計蛋白質の蓄積が、mRNAリズムから数時間遅れて発振するのは、正負調節のタイムラグを反映すると考えられている。真核生物の時計モデルでは、このタイムラグを生ずるための調節機構として、PER, TIM, FRQなどの核移行の調節、リン酸化を介する安定性の制御などが想定されている⁴⁾。ここではこの段階のモデルを単純フィードバック・ループ・モデルと呼ぼう。真核生物では、このモデルはその後interlockedフィードバックモデル(二つのフィードバックループのカップリング・モデル)、あるいは(より本質的な視点の変更を伴う)Zeitnehmerモデル(従来基本振動とされてきた時計遺伝子転写ループを、時計に制御される入力系因子として扱うモデル)として展開している。このあたりの事情は最近、総説にまとめたので参照していただきたい⁵⁾。以下、シアノバクテリアにおける単純フィードバック・ループ・モデルの再検討の一端を紹介しよう。

2. KaiA-KaiCの正負調節カップリング・モデル

単純フィードバックモデルでは、抑制因子(たとえばPER, FRQ, KaiC)の機能欠失株では、自身の転写が恒常的に高いレベルで維持されることが予想される。これに最も妥当しているのはアカパンカビの場合であり、FRQの機能欠失株*frq⁰*では内在性の*frq*遺伝子の発現レベルが、野生株での発現ピークレベル程度で維持される⁶⁾。ショウジョウバエの場合は必ずしもそうはならず、*per⁰*系統では*per* mRNAの蓄積レベルはむしろ低下する。これは、Hardinらの修正モ

デル(interlockedフィードバックモデル)では、*per*が活性化因子*dClk*の発現を活性化する機能を担っているとの修正条項によって一応解釈されている(*per⁰*系統では*dClk*の発現が低下することになり、結果として*per*の発現も抑制される)⁷⁾。ただし、*per⁰*系統での*per*プロモーター活性はかなり高いとの報告もあり、今ひとつ意見の一致を見ていないように思われる節もある^{8,9)}。

シアノバクテリアの*kaiC*欠失株の場合、*kaiC*プロモーター活性は野生株での発現レベルのピークレベルではなく、中間から若干下のレベルで維持される。したがって、KaiC以外にも*kaiBC*の抑制因子が存在するか、もしくはKaiC自身が何らかの形で*kaiBC*発現の活性化に関与する可能性が考えられた。

もともとKaiCが抑制因子と考えられたのは、KaiCの過剰発現により、*kaiBC*発現が顕著に抑制されたためである²⁾。そこで、筆者らは同様の実験を*kaiA*の機能欠失株で行った。その結果、野生株と異なり*kaiC*の過剰発現はむしろ緩慢な転写促進効果を示した。つまり、ある条件ではKaiCは転写活性化にも関与しうるらしい。いっぽう、野生株では*kaiA*を構成的に過剰発現すると*kaiBC*の転写が促進される。この実験を*kaiC*の機能欠失株で行うと、それほど顕著な転写促進効果が見られなかった。このことから、KaiAによる転写活性化にKaiCが関与している可能性が高い。もし、この考え方でよければ、KaiAとKaiCは協調して*kaiBC*発現調節ループに関与していることになる。また、KaiCがなんらかの形で*kaiBC*の発現を正に調節しているとすれば、従来の単純なネガティブ・フィードバックに加え、ポジティブ・フ

イードバックがカップリングしたようなモデルを想定することができる（岩崎ら、準備中）。

では、蛋白質レベルでKaiAとKaiCの協調はどのようにして起こるのだろうか。いまのところ、KaiA、KaiB、KaiCの蛋白質の生化学的な作用機構はまったく不明である。しかしながら、いくつか断片的に生化学的性質が報告されている。その一つは、Kai蛋白質が様々な組み合わせで相互作用できるという知見である¹⁰⁾。これは、酵母two-hybrid系、*in vitro*、シアノバクテリア細胞抽出液を用いた免疫沈降法などによって示されており、いくつかのリズム変異によってKai蛋白質同士の相互作用強度が変化することも知られている^{10, 11)}。第二の注目すべき性質はKaiC蛋白質のリン酸化である。KaiCは*in vivo*でCT16をピークとするリン酸化リズムを示す（西脇ら、準備中）。さらに、KaiCは*in vitro*で自己リン酸化能を示す¹²⁾。今のところ*in vivo*と*in vitro*のリン酸化の関係や、リン酸化の生理的意義は不明だが、KaiCの機能に密接に関与するものと期待できよう。そこで、KaiCの自己リン酸化アッセイの際に、等モル量のKaiAを添加すると、KaiCのリン酸化レベルが劇的に上昇した。KaiAによるKaiCのリン酸化促進効果は*in vivo*でも見られた。すなわち、*kaiA*欠失株においてリン酸化型KaiCは著しく減少しており、ほとんど確認できない。さらに、*kaiA*の様々なリズム変異体でKaiCのリン酸化レベルが大きく影響を受けていた。こうした事実は、KaiAとKaiCは蛋白質レベルの相互作用・翻訳後修飾制御を介して機能協調し、転写レベルの自己発現制御ループに関与していることを強く示唆

している。

3. SasA-KaiCによる二次ループ・モデル

KaiCはKaiA、KaiBのほかにSasAと呼ばれるヒスチジン・キナーゼと複合体を形成することが分かっている¹³⁾。ヒスチジン・キナーゼはバクテリアの主要情報伝達形式two-component系（二成分情報制御系）の構成因子である。この因子は、センサー領域で特定のシグナルやリガンドを関知し、ヒスチジン残基の自己リン酸化と共役応答因子へのリン酸化転移を介して、遺伝子発現など特定の生理活性を調節する役割を担う。SasAのセンサー領域はKaiBに相同性があり、KaiCが結合することができる。このことから、おそらくKaiC依存的なSasAのキナーゼ活性調節があるものと期待されている。その一方で、*sasA*破壊株で*kaiBC*の発現レベルが低下し、概日リズムは著しく低振幅化し、3時間ほど短周期化する。このことから、SasAとKaiCは互いに活性を制御するループ構造をなす可能性が高い。*sasA*破壊株では、概日発現遺伝子の多くは無周期化してしまう。SasAの構成的過剰発現は概日リズムを消失させ、また一過的な過剰発現は時刻依存的な時計の位相シフトを引き起こす。SasAは、KaiABCを中核とする基本振動発生の必須因子ではない。むしろ、KaiCを介して基本振動因子とカップリングする二次ループを形成することにより、基本振動を安定化させているのではないかと私たちは考えている。

興味深いことに、*sasA*破壊株におけるリズムの不安定化には、光照度依存性が観察されている¹³⁾。光照度が高いと無

周期化するが、低照度条件下では低振幅・短周期のリズムを観察できる。したがって、*sasA*は概日リズムの光照度補償とでも言うべき光調節機構（入力系）に参与していると思われる。さらに、*sasA*破壊株は連続明条件下では野生株と変わらず正常に生育できるが、明暗サイクル下では著しく増殖が抑制される。この性質は*kai*とは独立しており、*SasA*は概日制御以外にも明暗サイクル下での何らかの代謝に重要な機能を担っていると考えられる¹³⁾。

4. グローバルな転写システムを介する高次ループ・モデル

今まで紹介してきたモデルは、すべて*kaiBC*プロモーター活性の制御機構を中心として考えられてきたものである。確かに*kaiBC*は顕著な高振幅発現リズムを示すが、そうしたリズムを示すのはなにも時計遺伝子に限ったことではない。逆に、シアノバクテリアではほぼすべての遺伝子のプロモーター活性に概日リズムが見られる¹⁴⁾。これはプロモーター・トラップという巧妙な手法によって明らかにされた。まず、ランダムなゲノムDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合レポーター・ライブラリーをシアノバクテリアに導入する。もし、プロモーターがその断片に含まれていればルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘発し、形質転換体は発光する。得られた発光クローンの発光パターンの経時変化を見ると、すべてのクローンに関して概日リズムが見られたのである¹⁴⁾。本来概日リズムを示さない大腸菌の最小プロモーター領域でさえ、シアノバクテリアに一旦組み込まれれば顕著な概日リズム発現を引

き起こす¹⁵⁾。したがって、シアノバクテリアではなんらかの基本転写機構なし、それに影響を与える基本代謝機構自体が振動していると考えられるべきであろう。このとき、*kaiBC*の発現リズムはどのような意味を持つのだろうか？

まず、よく知られているショウジョウバエの例と比較して考えてみよう。ここでは概日発現する遺伝子は、DNAチップ解析によって調べられた限りで全ゲノム遺伝子の約5%程度らしい。したがって、基本転写システム自体が振動していると仮定する必要はない。むしろ個別の遺伝子に特異的な発現制御メカニズムが重要になってくる。事実、*per*や*tim*の発現制御は、bHLH-PAS族の（特異的）転写因子であるdCLK::CYC複合体による特定の*cis*エレメント（E-box）の制御を中核として理解されている¹⁶⁾。シアノバクテリアでも、従来は*per*の制御のように*kaiBC*の発現制御を中心としてモデルが構築されてきた。しかし、それはどの程度妥当なのだろうか？

片山らはKaiC蛋白質による*kaiBC*プロモーターへの抑制効果が、どの程度プロモーター特異的な応答なのかを検証した。プロモーター・トラップと誘導性過剰発現系をうまく組み合わせて調べた結果、*kaiC*過剰発現は、*kaiBC*のみならず多数のプロモーター活性に対してことごとく抑制的に作用することが見出された。抑制レベルは常に野生株における発現レベルの谷のレベルまでであった。このため、完全に発現がゼロレベルまで抑制される遺伝子は全体の数パーセントにとどまり、*kaiC*の構成的過剰発現株でも生育にはとりあえず支障がないらしい。いずれにせよ、この結果はKaiC蛋白質が自身のプロモーターにのみ働くの

ではなく、むしろゲノムワイドに作用することを強く支持している（中平・片山ら、準備中）。

そうなると、*kaiBC*プロモーター内の特定の *cis* エlementが *kaiBC* の発現リズムを引き起こすために必要なのかどうか問題となる。中平らは、*kaiBC* のプロモーターを大腸菌由来の誘導性プロモーターに置換しても、あるレベルで *kaiBC* を誘導させれば、ほぼ完全な高振幅リズムが維持できることを発見した（中平・片山ら、準備中）。つまり、*kaiBC* の発現リズム、ひいては概日リズムの発生には、*kaiBC* の特定の *cis* 領域はかならずしも必要ではない。*frq* 遺伝子を特定の誘導性プロモーターに置換したアカパンカビでは、さまざまなレベルで *frq* を誘導させてもリズムが回復することはない。ショウジョウバエでは、*tim* または *per* を特定の構成的プロモーターによって発現させてもリズムが観察される。しかし、得られたリズムはかなり低振幅になってしまう。さらに、その場合でも他方 (*tim* または *per*) の E-box による制御は維持されていることが必要と考えられている。

以上の結果から、私たちは Kai 蛋白質は特定の *cis* 配列ではなくなんらかの基本転写機構を直接または間接的に制御することによりゲノムワイドな概日発現を誘導し、その一環として *kaiBC* へのフィードバック制御が含まれると考えている。この際、興味深いことは KaiC 蛋白質が DNA 修復系の RecA 蛋白質や DNA ヘリカーゼの DnaB などの DNA 結合型 ATPase と弱い相同性を持つという事実である^{16, 17)}。たとえば、KaiC が RecA や DnaB のように染色体 DNA の高次構造（トポロジー）に影響することによ

ってゲノムワイドな概日制御を実現しているといった可能性は魅力的である。原核生物においても、ゲノム DNA はヒストン様蛋白質や様々な DNA 結合蛋白質などとともに核様体（nucleoid）とよばれる構造をとっている。この中には転写因子も存在し、大腸菌などでは、代謝変化に伴う染色体 DNA の高次構造レベルの制御が（特異的あるいは非特異的に）遺伝子発現を調節していることが知られている¹⁸⁾。シアノバクテリアから進化したと考えられる植物葉緑体のゲノム DNA の高次構造レベルで概日リズムが観察され、オルガネラ DNA 上の広範な概日遺伝子発現に重要であるとの指摘もある¹⁹⁾。したがって、この「染色体振動モデル」もあながち的はずれではないかも知れず、少なくとも現段階での有力な作業仮説の一つとして検討する価値があるだろう。

今回は詳しく述べなかったが、シアノバクテリアの概日システムは予想以上に深く必須の生体維持機構（たとえば染色体や基本転写装置）と結びついており、光合成などの代謝との関係性も今後の重要なテーマとなりつつある^{1, 5)}。今回紹介した知見が、時計機能に特化した遺伝子群による従来の分子機構モデルから、細胞全体を対象とするシステムバイオロジーとしての概日リズム研究への橋渡しの契機のひとつとなることを期待している。

本研究は、名古屋大学の近藤研究室にて、近藤孝男教授、中平洋一（現・京都府立大学）、片山光徳（現・東京大学）、西脇妙子、北山陽子の各氏、および Susan Golden（Texas A&M 大学）、Stan Williams（Texas A&M 大学）両氏

との共同研究として行われました。多くの未発表データを拝借させて頂きました、これらの素晴らしい共同研究者の皆様にご心からお礼申し上げます。

また、いつも刺激的・生産的な議論・助言をいただいている松本顕（九州大学）、上田泰己（東京大学、山之内製薬）、小山時隆（名古屋大学）の各氏にも感謝いたします。

- 15) Katayama M et al.: J. Bacteriol. 181: 3516-3524 (1999)
- 16) Leipe DD et al.: Genome Res. 10: 5-16 (2000)
- 17) Mori T and Johnson CH: Semin. Cell Dev. Biol. 12: 271-278 (2001)
- 18) Ishihama A: Annu Rev. Microbiol. 54: 499-518 (2000)
- 19) Salvador ML et al: Mol. Cell. Biol. 18: 7235-7242 (1998)

参考文献

- 1) Iwasaki H and Kondo T: Plant Cell Physiol. 41: 1013-1020 (2000)
- 2) Ishiura M, et al.: Science 281: 1519-1523 (1998)
- 3) Xu Y et al.: EMBO J. 19: 3349-3357 (2000)
- 4) Young MW and Kay S: Nature Rev. Genet. 2: 702-715 (2001)
- 5) 岩崎秀雄・近藤孝男: 細胞工学 20: 801-807 (2001)
- 6) Aronson BD et al.: Science 263: 1578-1584 (1994)
- 7) Glossop NR et al.: Science 286: 766-768 (1999)
- 8) Brandes, C et al.: Neuron, 16: 682-692 (1996)
- 9) Stanewsky, R. et al: EMBO J. 16: 5006-5018 (1997)
- 10) Iwasaki H et al: EMBO J. 18: 1137-1145 (1999)
- 11) Taniguchi Y et al.: FEBS Lett. 496: 86-90 (2001)
- 12) Nishiwaki T et al.: PNAS 97: 495-499 (2000)
- 13) Iwasaki H et al.: Cell 101: 223-233 (2000)
- 14) Liu Y et al: Genes Dev. 9: 1469-1478 (1995)

キイロショウジョウバエ *per⁰¹* 系統における 概日歩行リズムの温度依存的発現

松本 顕

九州大学大学教育研究センター

per⁰¹ の恒暗条件 (DD) での歩行活動をさまざまな温度条件下で計測し、19℃の比較的低温の条件下では3割近い個体は何らかの概日周期性を示すことを見出した。続いて、周期性を示した個体同士の交配実験を行い、この表現型には複数の遺伝的要因が影響を与えること、およびキイロショウジョウバエには複数の *per* 非依存的な概日振動体 (*perless oscillator*; 以下 PLO と略) が存在している可能性を見出した。これらの結果とともに GeneChip を用いた周期的な遺伝子発現の網羅的同定に関する実験結果を簡単に概略し、最近提唱されている、いわゆる Zeitnehmer 説がショウジョウバエでも成り立ちうるかどうか考察した。

1. はじめに

概日時計機構の分子メカニズムの研究は、キイロショウジョウバエの突然変異体を用いた実験で進展してきた。現在、*period* 遺伝子 (*per*) の転写に関する負の自己フィードバックループを中心とした概日時計の分子メカニズムのモデルが提唱されている³⁾。このループにかかわる分子として PER タンパクの安定化や核輸送を行う *timeless* (*tim*)、PER の早期崩壊に関与するキナーゼ *double-time* (*dbt*)、*per* や *tim* の正の転写因子である *dClock* (*dClk*) と *cycle* (*cyc*) が同定されており、これらの分子の哺乳類でのホモログも見つかっている³⁾。時計遺伝子の負の自己フィードバックループは、シアノバクテリアやアカパンカビでも見つかっており、種を超えた概日振動の発振メカニズムではないかと考えられるに到っている³⁾。

ところが、最近アカパンカビでは、こ

のフィードバックループが機能しないはずの *frq null* 突然変異株でも概日リズムが存在している可能性が指摘されている^{7, 8)}。これらのデータをもとに、これまで時計遺伝子と考えられて来た一連の遺伝子を、概日振動を生み出す中枢で機能しているのではなく、概日時計からの影響を受けて振動しつつ、概日時計への入力系の役割も果たしている Zeitnehmer としてとらえ直そうとする考えも提唱され始めている^{6, 9)}。

一方、キイロショウジョウバエにおいても分子レベルでの解析が急進展する以前から、いわゆる無周期系統の *per⁰* で、本当に概日時計機構が全く機能しないのか? という疑問がもたれて来た。たとえば、Helfrich と Engelmann⁴⁾ は *per⁰* であっても同調可能な光サイクルの周期には限界があるというデータから、概日時計機構は潜在的には *per⁰* にも存在している可能性を示唆している。また、Dowse と

Ringo²⁾は、最大エントロピー法を用いて、DDでの per^0 の歩行活動にある種の概日周期を検出している。

ところで、 per 遺伝子の別の突然変異体で、周期の長さに影響する per^s と per^l は温度が高くなるほど、それぞれ、より短い、あるいはより長い周期を示すことが報告されていた⁵⁾。これは、温度が高いほど、その表現型が著しくなるとも解釈可能である。そこでわれわれは、 per^{0l} のDDでの歩行活動のさまざまな温度条件下での計測を行った。

2. 低温条件における per^{0l} 系統の活動

ショウジョウバエのDDにおける歩行活動を赤外線ビームの遮断回数によって計測した。得られたデータの周期性は χ^2 ピリオドグラム法によって分析した。仮周期は16-32時間の間に設定した。28℃の高温条件では、野生型のCanton-Sは明瞭な概日リズムを示すのに対して、 per^{0l} 系統は完全に無周期であった。続いて、通常の飼育温度である24℃での計測を行った。64個体中7個体が16-32時間の範囲で、なんらかの周期性を示した。19℃の低温条件下では、81個体中21個体が周期性を示すことが分かった(図1)。これらの結果を表1に示す。19℃では、20~28時間の周期性を示す個体が多かった。ピリオドグラム解析で2つの周期成分を示した個体もあった。サブピークを20-28時間の範囲に持つ個体数を表1の括弧の中に示した。これらの個体では複数の周期成分が1個体に認められたことになる。

3. 無周期突然変異体における低温条件下での周期出現

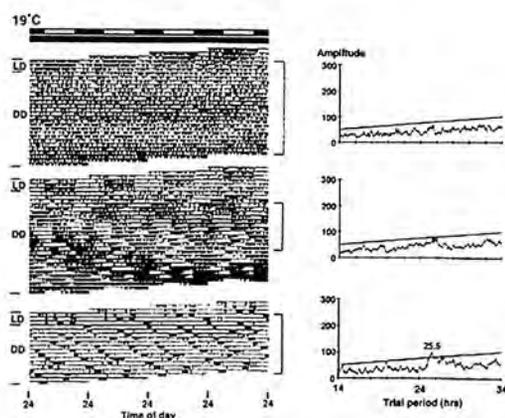


図1 19℃での per^{0l} の歩行活動リズム。LD12:12に数日間置いたのち、DDに移した。各個体のアクトグラムは、4日分を1段に並べて表示している。周期分析は χ^2 ピリオドグラム法を用いて行った。上から、無周期の個体、視察法では周期性が認められるがピリオドグラムでは有意な周期成分が検出されなかった個体、ピリオドグラムで周期が検出された個体を例示した。今回は、最下段のようにピリオドグラムで有意な周期性を示した個体だけを τ 周期を示した個体 τ として扱っている。

表1 Temperature dependency of rhythm expression in per^{0l} .

Temperature (°C)	N	N _r	The range of period (hr)		
			16-20	20-28	28-32
28	50	0	0	0	0
24	64	7	1	2	4
19	81	21	8(4)	14(1)	5(1)

N: Number of flies tested.

N_r: Number of rhythmic flies.

(): Number of flies which showed another period in the range from 20 to 28 hr.

per^{0l} 系統において高頻度で周期が観察されたことに関して、低温環境下では per^{0l} 突然変異で生じているストップコドン¹⁾が機能せず、翻訳時にread throughされた結果、ほぼ完全に近い形のPERタンパク質が発現している可能性がある。そこで、 per 遺伝子の欠失系統(per^- 系統)を用いて、19℃での周期出現率を調

表2 Number(%) of flies showing circadian rhythm in various clock mutants at 19°C.

Strains	N	rhythmic flies (%)
<i>per⁻</i>	24	29.2
<i>tim⁰¹</i>	15	26.7
<i>dClk^{dk}</i>	15	13.0
<i>cyc⁰¹</i>	16	18.8

N: Number of flies tested.

べた。同時に、これまでショウジョウバエで見ついている無周期突然変異体に関しても調べた。*per*-系統では、*per*遺伝子のプロモーター領域やcoding領域を含む比較的広い範囲で染色体欠失が生じており、PERタンパク質はもとより、*per* mRNAの転写も生じていない。

結果を表2に示す。*per*-や*tim⁰¹*では、全体の1/4をこえる個体で、概日周期を示すものが見つかった。*per*遺伝子や*tim*遺伝子の転写活性化因子である*dClk*や*cyc*遺伝子の無周期突然変異体でも、*per*-や*tim⁰¹*と比較すれば割合は低いものの周期性を示す個体が見つかった。これらの結果は、低温下における概日周期の出現は、*per⁰¹*突然変異によるストップコドンがread throughされてPERタンパク質が発現することによるものではないことを示唆している。さらに、*per⁰¹*系統に限らず、既知の無周期突然変異体では頻度の差はあるものの、いずれも低温条件下で周期性を示す個体が出現することが示された。

4. 遺伝的要因の影響

*per⁰¹*系統で低温条件下において周期性が回復する個体の割合は、複数の実験を通して、常に約3割程度であった。そこで、この現象が何らかの遺伝的要因の影

表3 Number (%) of *per⁰¹* flies with or without circadian rhythm in various genetic backgrounds at 19°C.

strain	N	Circadian rhythm	
		Yes	No
<i>per⁰¹</i> (original)	134	29.1	70.9
<i>per⁰¹</i> (out crossed)	43	9.3	90.7
<i>per⁰¹</i> (Hall's lab.)*	177	4.5	95.5

N: Number of flies tested.

* Hamblen et al. (1986) J. Neurogenet. 3: 249-291.

表4 Number (%) of rhythmic flies at different temperatures.

Strains	Temperature (°C)		
	19	24	29
<i>per⁰¹</i> (Generation-2)	25.3 (91)	19.4(154)	17.1 (35)
<i>per⁰¹</i> (Generation-7)	52.6 (19)	22.0 (59)	19.6 (51)

(): Number of flies tested.

響を受けるのかどうかに関して実験を行った。まず、*per⁰¹*系統と野生型Canton-Sとの交配を繰り返すことで、遺伝的なバックグラウンドを元の*per⁰¹*系統から野生型に置換した系統(out cross系統)を確立した。ただし、実験の都合上、*per*遺伝子が存在する性染色体はもとの系統からそのまま引き継がれている。out cross系統に関して19°Cでその周期性を調べた(表3)。元の*per⁰¹*系統は計測個体の約3割のものが概日周期を示していたが、野生型とのout crossを行うことによって、その頻度が1割ほどに低下したことが分かる。

続いて、上記の実験とは逆に、毎代明瞭な周期性を示した個体同士を選別して交配する実験を行った。結果を表4に示す。24°Cや29°Cでの周期性の出現率は、選別交配を2回繰り返しただけの比較的早期から若干の上昇を示したが、以降は交配を繰り返しても、ほとんど影響を受

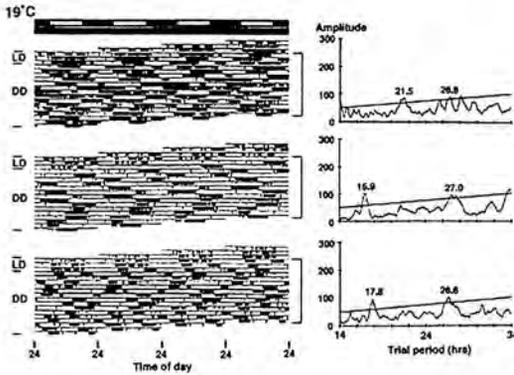


図2 選抜による近交系の歩行活動リズム。実験条件は図1に準ずる。周期性を示した個体同士の選抜交配を繰り返すことで、19°Cでの周期出現率を約50%まで高めることができた(表4)。幾つかの近交系では、周期性を示した個体のほぼ全てで、長短2つの周期成分が観察された。

けなかった。19°Cでの周期の出現率は、選別交配を7回繰り返した時点で50%を超えたが、以降は、選別を繰り返しても、周期性出現頻度の上昇は見られなかった。すなわち、選別交配は低温下での周期性発現に影響を及ぼすこと、しかし一方で、全ての個体が周期性を示すようになる訳ではないことが示された。これらの近交系の中のある系統では、周期性を示した個体のほとんどで長短2つの周期成分が観察された(図2)。これは、周期の異なる複数のPLOが、ショウジョウバエ1個体中に存在する可能性を示唆している。

5. GeneChipによる周期的遺伝子発現の網羅的な同定

ショウジョウバエのオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(GeneChip)を用いて、明暗サイクル下で周期的に発現している遺伝子の網羅的な同定を試みた¹⁰⁾。野生型では約700個の遺伝子がショウジ

ョウバエ頭部で周期的に発現していた¹⁰⁾。その中には、これまで視覚系への関与が示唆されていた遺伝子が約20個含まれていた。

続いて、*per* feedback loopが機能していないと考えられる*dClk^{IRK}*突然変異体を用いて同様の実験を行ったところ、上記の視覚系遺伝子を含む、ほぼ全ての遺伝子の周期的な発現が停止していることがわかった¹⁰⁾。このことから、ショウジョウバエでは、少なくとも遺伝子発現の周期性に関しては、*per* feedback loopがほぼ唯一の発振源となっていることが推測された。

6. おわりに

以上のように、これまで無周期であると考えられて来た*per^m*系統でも低温条件下では概日周期性を示す個体が存在すること、この表現型が複数の遺伝的な因子の影響を受けていることがわかった。さらに、*per^m*だけでなく既存の無周期突然変異体のどれもが、低温条件下では、ある程度の割合で概日周期性を示すこともわかった。GeneChipを用いた実験からは、これまで視覚系で働いていることが分かっていた約20個の遺伝子を含む多数の遺伝子が周期的に発現していること、*per* feedback loopが機能しない突然変異体では、ほぼ全ての遺伝子の周期的発現は起こらないことが明らかになった。

これらのことを総合すると、ショウジョウバエの脳内には何らかのPLOが複数存在しており、それらは周期的な遺伝子発現を伴わずに概日振動を生み出す機構である可能性が推測される。RoennebergとMorrow⁹⁾は、光合成系の代謝のリズムが時計遺伝子のfeedback loopとは別

に概日振動の発振源として働いている可能性を考慮したモデルを提起している。今回見いだされた *per⁰¹* の周期性が生理的な代謝機構を背景にしているのかどうか、どのくらいの数の遺伝的要因がそれに関わっているのかなどの詳細な解析は今後の課題である。また、低温条件で特に周期性の回復が顕著な理由の解明も重要な課題と考えられる。

今回得られた結果をアカパンカビで提唱されている Zeitnehmer 説^{6, 9)} に当てはめてみると、少なくとも GeneChip を用いた実験から同定された約 20 個の視覚系遺伝子群は Zeitnehmer と呼んでも差し支えがないように思われる。しかしながら、ショウジョウバエにおいて *per* 遺伝子を含む既存の時計遺伝子を Zeitnehmer として捉えなおすことが可能かどうかについては、今後も慎重な検討が必要とされるであろう。既存の時計遺伝子が Zeitnehmer であるならば、それら以外に概日リズムの発振機構が存在するはずである。この立場から、*per⁰¹* が低温条件下で示すリズムが本当に概日リズムと呼べるものかどうかを、環境リズムに対する同調性や外的な擾乱に対する位相反応性といった側面から詳細に検討することが必要と思われる。また、*per⁰¹* での周期性の出現率に影響を与える遺伝子群の同定も必須であろう。さらに、PLO がショウジョウバエのどの組織、器官に備わっているのかも明らかにすべき問題の 1 つである。

謝辞

有意義な御助言を頂いた名古屋大学大学院理学研究科の岩崎秀雄先生にお礼申し上げます。

本研究は、以下の先生方との共同研究として行ったものです。共同研究者の方々にお礼申し上げます。以下に敬称を略して列記させていただきます。

九州大学大学院理学研究院 谷村禎一。
山口大学理学部 千葉喜彦、富岡憲治、
治井由佳。
山之内製薬株式会社ゲノム創薬研究室
橋本誠一、上田泰己、河村美穂。

参考文献

- 1) Baylies et al.: Nature 326: 390-392. (1987)
- 2) Dowse, Ringo: J. Biol. Rhythms 2: 65-76. (1987)
- 3) Dunlap: Cell 96:271-290. (1999)
- 4) Helfrich, Engelmann: Z. Naturforsch. 42:1335-1338. (1987)
- 5) Konopka et al.: J. Neurogenet. 6:1-10. (1989)
- 6) Lakin-Thomas: Trends Genet. 16:135-142. (2000)
- 7) Lakin-Thomas, Brody: Proc. Nat. Acad. Sci. UAS 97: 256-261. (2000)
- 8) Mellow et al.: Nature 399: 584-586. (1999)
- 9) Roenneberg, Mellow: J. Biol. Rhythms 14: 449-459. (1999)
- 10) Ueda et al.: J. Biol. Chem. in press. (2002)

追補

脱稿後、*per⁰¹* の示す周期性を記述した論文を目にしたので紹介する。

- 11) Helfrich-Förster: J. Insect Physiol. 47: 877-887. (2001)

ショウジョウバエ概日時計の ゲノムワイドな発現解析

上田 泰己

山之内製薬(株) NEDO-GIプロジェクト システムバイオロジーグループ
東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学教室

我々はショウジョウバエ概日リズムに関与する遺伝子群を網羅的に解析するため、体系的かつ定量的な全RNAの発現解析を行った。全遺伝子の振動解析を行い発現パターンの順位づけを行った結果、全時計遺伝子が高順位に含まれることが明らかになった。次に遺伝子機能データベースから遺伝子機能カテゴリー情報を取得し、概日リズムで制御されている生理機能を系統的に予測することに成功した。さらに、各酵素の発現パターンを代謝データベースを用いて解析した結果、概日リズムで振動している可能性の高い物質を見出した。最後に全遺伝子を染色体上にマップし、隣接する遺伝子の発現パターンを比較することによって、クロマチン高次構造変換によって転写制御が起こっている可能性が高い染色体領域を発見した。網羅的遺伝子発現情報を各種データベースを用いて統合的に解析することで、新しい生理現象・物質・制御が明らかになりつつある。

1. 真核生物のゲノムプロジェクト

ゲノムプロジェクトにより出芽酵母⁴⁾、線虫¹⁰⁾、ショウジョウバエ¹⁾、シロイヌナズナ¹²⁾、ヒト⁹⁾、¹⁵⁾など真核生物のゲノム配列が1997年から次々と明らかになってきている。2002年の出芽酵母の近縁種である分裂酵母¹⁶⁾のゲノム配列決定に象徴されるように、ゲノムプロジェクトは現在近縁種のゲノム配列決定へと移行しつつある。例えばヒトの近縁種であるマウス、シロイヌナズナと同じ高等植物であるイネなどのゲノムプロジェクトが既に進行しており、近年中に公開されることになっている。また線虫、ショウジョウバエについても近縁種のゲノムプロジェ

クトが既に始まっている。さらにパブリックに進行しているゲノムプロジェクト以外にも、イネやマウスのゲノムはベンチャー企業がゲノム解読の終了を発表しており、一部の製薬企業やアカデミアが既に有料でデータベースを利用している。今後「二本目のゲノム」つまり近縁種のゲノムが決定されていくことによって比較ゲノムが可能となり、プロモーター上での近縁種間での保存領域が次々と明らかになっていくことが予想される。時計遺伝子のPer1のマウス・ヒト間での比較ゲノム⁸⁾によって明らかになった保存領域に5つのE-boxやDBPの結合配列がマッピングされたように、近縁種間で

の保存上流領域を同定することで、遺伝子の転写制御に関する情報が急速に明らかになっていくことが予想される。概日時計研究のように転写の制御が重要な役割を担っている生命現象の研究分野にとって、ここ数年の近縁種ゲノムプロジェクトの進行は無視できないものとなるはずである。

2. 網羅的発現解析技術

ゲノム配列の決定を受けて近年のもう一つの大きな技術革新が進行している。ジーンチップやcDNAマイクロアレイのような網羅的発現解析技術である。一度の実験で一萬を超える遺伝子の発現状態を把握できる技術が、多少割高ではあるが現実のものとなっている。概日時計の研究でもシロイヌナズナ⁷⁾を皮切りにラット⁶⁾、ショウジョウバエ^{3, 10, 11)}と網羅的な発現解析が行われている。網羅的発現解析によって得られるデータは非常に多くの情報を含んでおり、さまざまなデータと統合させて解析していくことによって有用な情報を引き出すことができる。例えば似たような遺伝子発現を示す遺伝子の近縁のゲノム配列を解析することで転写制御配列を抽出することが可能である¹¹⁾。現在はヒト、マウス、ショウジョウバエ、シロイヌナズナのような高等真核生物においては、転写開始点近傍の情報が完備されていないので網羅的なプロモーター解析が困難ではあるが、近縁種ゲノム間での比較ゲノムが可能となれば、保存領域だけを解析することで転写制御配列を探索する領域を劇的に減らすことが可能である。例えばPer1の場合、ヒト・マウス間での保存領域の総和は~1kbであり⁸⁾、この値は酵母のプロモータ

ー領域(数百bp)と近いオーダーである。ゲノムプロジェクトや網羅的発現解析が生み出す膨大なデータの出現によってバイオインフォマティクス分野の生物学研究における重要性が現在急速に高まっている。本総説では以上のような研究の流れを意識しながらショウジョウバエの概日リズムのゲノムワイドな発現解析¹¹⁾およびそのデータの解析について簡単に述べたい。

3. ショウジョウバエ概日時計の発現解析

我々はショウジョウバエにおける概日時計がどのようにして広汎な遺伝子発現を制御しているのかを理解するためにオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(GeneChip)を用いて明暗条件、恒暗条件でショウジョウバエのゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った。2週間明暗条件で同調させたショウジョウバエの成虫を明暗条件あるいは恒暗条件に置き、2日間にわたって4時間おきにサンプリングを行った。約100匹のショウジョウバエの頭部から抽出した総RNAを用いてGeneChip解析を行ったところ、振動していることが知られている時計遺伝子あるいは時計関連遺伝子全て(*period*, *timeless*, *clock*, *cryptochrome*, *vriille*, *takeout*)が、高い振幅で振動していることが見出された。別途測定した定量的PCRのデータと比較したところ、位相のみならず振幅の大きさまで近似した定量性の非常に高いデータがGeneChip解析から得られることがわかった。これらの遺伝子の発現データには共通して1) 振動が美しい、2) 振幅が大きい、という2つの性質が見出された。1) は概日周期の余弦波との相関係数が有意に高いという客観的な

表現に言い換えることが可能である。2) はサンプリングノイズに比べて発現データの変動が有意に大きいと言い換えられる。1)、2) それぞれの性質について波形フィルター、振幅フィルターを作成し、両フィルターとも95%のランダムデータをカットするように閾値を定めた。このようにして抽出された振動遺伝子は明暗条件で約712遺伝子、恒暗条件で454遺伝子であった。このうち115遺伝子が両方の条件で概日振動していた(図1)。次にこれらの遺伝子の発現振動が時計

によって制御されているのかを確かめるために、Clock変異体での発現解析を行った。明暗周期で4時間ごとに2日間にわたってサンプリングし、GeneChip解析を行ったところ、これらの遺伝子の大部分の発現振動がClock変異体では消失することが見出された(図1)。さらに115遺伝子を形の美しい順(余弦波との相関係数が高い順)に並べ替えてみると、1位が*timeless*、3位が*vri*、5位が*clock*、7位が*cryptochrome*、23位が*period*、24位が*takeout*、と高順位に時計遺伝子、時

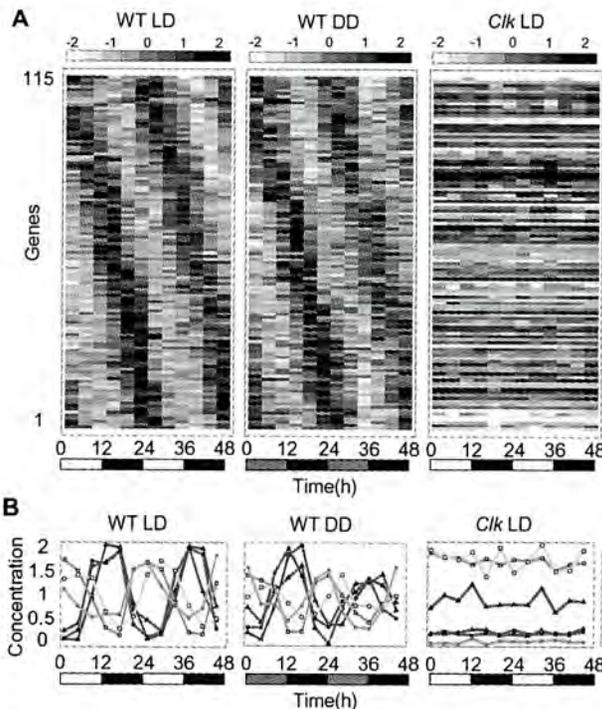


図1. ショウジョウバエ頭部のゲノムワイドな発現解析

- A. 野生体および*Cik*変異体における概日振動遺伝子の発現。野生体(WT)の明暗条件(LD)および恒暗条件(DD)の時系列データは平均、標準偏差がそれぞれ0、1になるように正規化してある。*Cik*変異体(*Cik*)の明暗条件(LD)の時系列データは、野生体の明暗条件での時系列データの平均値を減じ、標準偏差で除してある。野生体の明暗条件での位相(ピークの時間)および恒暗条件での位相(ピークの時間)を推定し、2つの位相の平均値を計算して、その値が早い順に遺伝子を並べ替えている。概日振動遺伝子の野生体の明暗条件、恒暗条件での振動は*Cik*変異体の明暗条件ではほとんど消失する。
- B. 時計遺伝子および時計関連遺伝子の時系列データ。野生体(WT)の明暗条件(LD)および恒暗条件(DD)の時系列データは平均値が1になるように正規化してある。*Cik*変異体(*Cik*)の明暗条件(LD)の時系列データは、野生体の明暗条件での時系列データの平均値で除してある。

計関連遺伝子が集中することがわかった。すなわち時計機能に深く関わっていると予想される遺伝子ほどこの順番付けで上位に位置することが予想される。

概日時計によって生体の代謝が制御されていることが知られている。時計によって物質の代謝がどのように制御されて

いるのかを推測するために、代謝のデータベースと発現情報とを統合的に解析することを試みた。最初に代謝物質のデータベースであるLIGANDデータベース⁵⁾からショウジョウバエのゲノムの中で現在知られている酵素群および酵素によって触媒される生体物質のデータを取得し

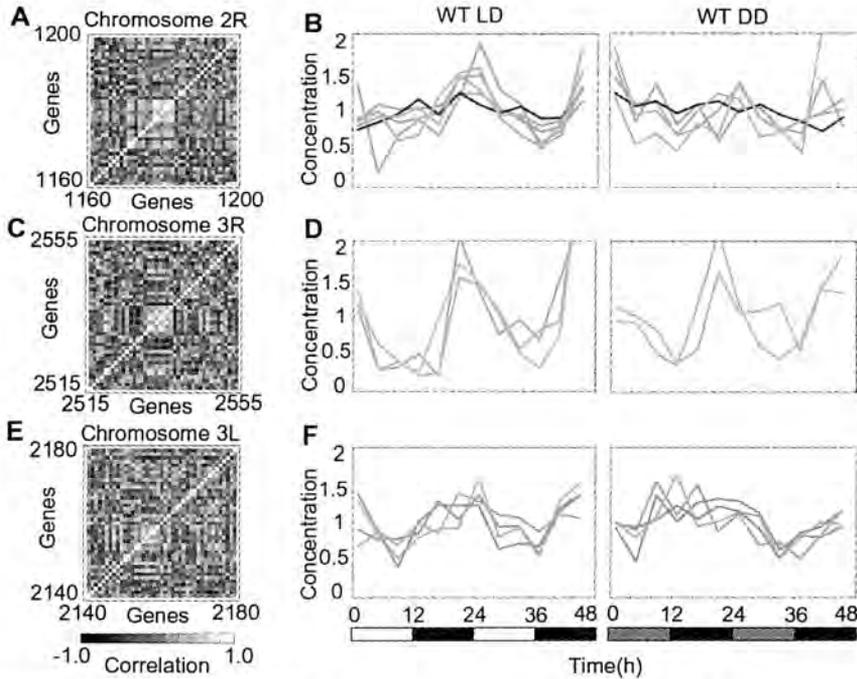


図2. 染色体近傍領域の共発現領域。発現相関マップ (A, C, E) の明るい正方形は2つの遺伝子の時系列データの相関係数が高いことを示している。縦軸、横軸上の番号は染色体上の遺伝子の番号 (染色体左腕あるいは右腕の左端に存在する遺伝子を1とする) を示す。共発現している遺伝子の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) の時系列データ (B, D, F) は各条件における平均発現量が1となるよう正規化してある。

- A. 第2染色体右腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する6つのP450遺伝子 (Cyp6a17, Cyp6a23, Cyp6a19, Cyp6a9, Cyp6a20, Cyp6a21) の共発現領域を示している。
- B. 6つのP450遺伝子 (Cyp6a17, Cyp6a23, Cyp6a19, Cyp6a9, Cyp6a20, Cyp6a21) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。
- C. 第3染色体右腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する3遺伝子 (CG11891, CG11889, CG10513) の共発現領域を示している。
- D. 3遺伝子 (CG11891, CG11889, CG10513) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。
- E. 第3染色体左腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する3遺伝子 (CG7646, CG7654, CG7433) の共発現領域を示している。
- F. 3遺伝子 (CG7646, CG7654, CG7433) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。

た。次に明暗条件、恒暗条件それぞれにおいて概日振動遺伝子のリストと各生体物質のリストを比較検討した。具体的には、一つの物質が関わる反応を触媒する酵素群の中から概日振動遺伝子を数え上げ、そのような状態が偶然に起こる確率を超幾何分布を用いて計算した。P値(-Log(確率))が高い順に物質を抜き出した結果、いくつかの生体物質がショウジョウバエの頭部で振動していることが示唆された。特に、明暗条件においては、GABA、グルタミン酸などの神経伝達物質や、NADPH、NADH、NAD、NADHなどの細胞内での酸化還元反応に重要な物質などが振動していることが示唆された。酸化還元物質の振動はMcKnightらが報告しているClockやNPAS2のDNA結合活性がNADPHの酸化還元状態による制御されているという報告と関連して注目している。またショウジョウバエにおける光情報の伝達にGABAやグルタミン酸がどのように関わっているのか興味深い。この他にもGeneOntologyデータベース²⁾という遺伝子の機能分類を行っているデータベースからその機能カテゴリーと各カテゴリーに分類される遺伝子名のリストを取得し、明暗条件、恒暗条件で振動していると予測される生理現象を抽出している。この手法によって例えば光受容のシグナル伝達系が有意に明暗周期で振動していることが予測されている。

最後に概日時計による転写制御機構について解析するために全てのショウジョウバエ遺伝子を染色体上にマップした。染色体上で近傍に存在する遺伝子群が共通した発現制御を受けている部分を抜き出したところ、染色体上で複数の領域が共通な発現制御をうけていることがわか

った(図2)。このような染色体領域の制御の詳細はまだわかっていないが、概日時計によって染色体の高次構造が制御されている可能性があるのではないかと考えている。

4. おわりに

現在概日振動遺伝子の転写開始点をゲノムワイドに決定している。これにより概日時計の分子機構の詳細があきらかになってくるのではないかと期待している。概日時計を単なる振動体ではなく時計たらしめている分子機構とはどのようなものであろうか?単純な負のフィードバックよりも複雑な機構が予想される概日時計の分子システムの全貌の解明に向けて、ゲノムプロジェクトの成果や最近の技術革新を最大限に利用できればと考えている。

参考文献

- 1) Adams MD, et al.: *Science* 287: 2185-2195. (2000)
- 2) Ashburner M, et al.: *Nat Genet* 25: 25-29. (2000)
- 3) Claridge-Chang A, et al.: *Neuron* 32: 657-671. (2001)
- 4) Goffeau A, et al.: *Nature* 387: 5 (1997)
- 5) Goto S, et al.: *Nucleic Acids Res* 28: 380-382 (2000)
- 6) Grundschober C, et al.: *J Biol Chem* 276: 46751-46758 (2001)
- 7) Harmer SL, et al.: *Science* 290: 2110-2113 (2000)
- 8) Hida A, et al.: *Genomics* 65: 224-233 (2000)
- 9) Lander ES, et al.: *Nature* 409: 860-921

- (2001)
- 10) McDonald MJ and Rosbash M: *Cell* 107: 567-578 (2001)
 - 11) Roth FP, et al.: *Nat Biotechnol* 16: 939-945 (1998)
 - 12) The_Arabidopsis_Genome_Initiative: *Nature* 408: 796-815 (2000)
 - 13) The C. elegans Sequencing Consortium: *Science* 282: 2012-2018 (1998)
 - 14) Ueda HR, et al.: *J Biol Chem* 19: 19 (2002)
 - 15) Venter JC, et al.: *Science* 291: 1304-1351 (2001)
 - 16) Wood V, et al.: *Nature* 415: 871-880 (2002)

第8回日本時間生物学会山口大会の報告

井上 慎一

(山口大学理学部)

日本時間生物学会の第8回学術大会を山口で開催するに当たり、多くの先生方にご協力をいただき、ありがとうございました。おかげさまで、大変実りある集会となり、責任を全うすることが出来ました。いたらぬ点は多かったと思いますが、その点はどうぞご容赦ください。

この大会は山口大学時間生物学教室の井上慎一を大会長、富岡憲治を副大会長として、2001年11月14日、15日の両日山口市の山口駅前ばるるプラザ山口を会場として行われた。山口県は本州の西の端で、必ずしも交通の便がよいとは言えない土地にあるので、東京や大阪の大会のように人が集まるかどうか、我々は心配していたが、参加人数は200人を超え、前回の東京大会に匹敵する人数が参加してくださり、まずまずの盛会であった。今年は、生物時計をテーマとする国際シンポジウムなどが何回か日本で行われたこともあり、とりわけ基礎系の参加者数の減少が懸念されていたが、杞憂に終わらせることが出来た。

さて、今年は原点に戻って、特に会員の研究発表を中心に学会のプログラムを構成した。シンポジウムは臨床系2題、基礎系2題として、どちらのシンポジウムも同じ会場で行うようにして、臨床の先生が基礎の話を、基礎の研究者が臨床の話を聞きやすいように配慮した。そのほかに山口大学に新たに設立された時間学研究所との共催で、時間を哲学や社会

学のテーマとして研究している時間学研究所所員の講演による公開の特別セミナーを企画した。それは、「時間について考えよう」と題し、哲学の入不二基義氏と、社会学が専門の辻正二氏にそれぞれ専門の中で、時間について研究している内容をわかりやすく話していただいた。時間生物学会は時間を対象とする学問の一つであるが、時間を意識することはあまりない。今回の講演が、時間生物学会の会員の先生方にも、自分たちが一翼を担っている時間の研究の幅の広さと多様性を考える一助となれば、企画を立てた人間として、大きな喜びである。

企画したシンポジウム講演は、時間生物学の指導的研究者が、最先端の、もっともホットな話題について研究を紹介するシンポジウムと、若手の気鋭の研究者が、将来の方向性を自由なディスカッションの中で探ってゆこうとするワークショップの二本立てで行なった。基礎系のシンポジウムは今年、山口大学が幹事校だということや、生物時計の分子機構については大きな国際シンポジウムが行われた事も考慮して、いままでこの学会であまり取り上げられなかった光周性をテーマとして行われた。それが富岡憲治氏がオーガナイズした「季節への適応機構を探る—光周測時機構の比較生物学」である。一方、臨床系のシンポジウムは、大川匡子氏と太田龍朗氏をオーガナイザーとして、「心と生物時計」をテーマと

して行われた。リズムというある意味では基本的な機能が複雑な高次機能の複合である「心」の問題と深く結びついていることはある意味で驚きであった。ワークショップとしては基礎系が岩崎秀雄、吉村崇氏が企画した「生物リズムの理論的基礎と多様性」、臨床系が鯛岡直人氏がオーガナイズした「呼吸器領域における時間医学の臨床応用」の2つが行われた。どの会場でもこれから研究の中心になるであろうテーマの研究が語られ、時間生物学の方向性が明示された。シンポジウムの企画、構成に当たられたオーガナイザーの先生方には深く感謝しないわけにはゆかない。ただ、大会の責任者の常であるが、次々と気になることが発生し、落ち着いて、シンポジウムやワークショップに参加できなかったことが悔やまれる。

一般演題は口頭発表が40題、ポスター発表が43題であった。時間生物学会は生物リズム研究会と臨床時間生物学会が合同して作られた学会であるが、第1回の生物リズム研究会がわずか4題の講演しかなかった事を知っている者からするとこの100題近い発表数に隔世の感がある。ポスター前でも活発な議論が行われていたが、口頭発表にも多くの質問が飛び交って、大変アクティブな印象を受けた。中でも特に、生物時計の分子機構に関する研究が数も多く、内容も充実していた。ここ数年の爆発的な研究の進展が、若い研究者を惹きつけていることが実感することが出来た。それに引きくらべて、気になるところもあった。私の目にはかつて、この学会の中心であった、臨床系の研究者が時間生物学会から離れていっているような不安を持った。臨床系のセッションでは聴衆も少なく、反応も今ひと

つであったような気がしている。臨床系の研究者をもう一度時間生物学会に引き戻す努力をしなければならないことを改めて会員のみなさまに訴えたい。

山口はフランシスコ・ザビエルが滞在し、その時初めて、西洋式の時計を日本に持ち込んだ歴史を持っている。その地で、生物の時計とその臨床応用をテーマとする学会が開かれたことは何よりうれしいことであった。最後に、この学会開催に当たって、援助をいただいた山口市コンベンションビューローや、山口大学、会場を貸して下さったばるるプラザ山口の関係者に改めてお礼を申し述べたい。また、参加して下さった、すべてのみなさまの今後の発展を祈念していることを付け加えておく。

第1回時間生物学世界大会

第1回時間生物学世界大会（World Congress for Chronobiology：WCC）が2003年9月9日-12日に札幌市北海道大学キャンパス内で開催されます。本国際学会は、各国の時間生物学関連学会が結集して作られた時間生物学会世界連合（World Federation of Societies for Chronobiology：WFSC）の記念すべき設立大会で、日本時間生物学会を主催学会として運営されます。本学会は第10回日本時間生物学会大会も兼ねています。

WFSCの規約により、大会長はWFSCの理事会で推薦され運営の責任を持ちます。主催学会が運営に責任をもつのが本来の姿ですが、国によっては学会の財政的基盤が弱いために、当分この形で進めることとなります。WCCは4年に1回開催されます。

加盟学会から選出された国際プログラム委員と主催学会員を主体とするプログラム委員で特別講演やシンポジウムなどのテーマを検討します。札幌大会では、発表は3トラック制とし、9題の特別講演・教育講演、18題のシンポジウムの他、ポスターセッションを計画しています。一般応募は原則的にポスターセッションとなります。加盟学会は少なくとも1題のシンポジウムを企画することが要請されています。今年の8月までに特別講演やシンポジウムのテーマを決め、10月から演題募集、参加登録を開始します。参加登録や抄録提出はすべてインターネット（UMIN）を使用します。

サチライトシンポジウムとして、大会の前日（9月8日）に第10回生物リズムに関する札幌シンポジウムが開催されます。その他、会期前後に大会会場を使用したサチライトシンポジウムを募集（有料）しております。

日本時間生物学会会員の皆様のご参加を心よりお待ちしております。

第1回時間生物学世界大会
第10回日本時間生物学会大会
大会長 本間研一

第1回時間生物学世界大会

○組織委員会

委員長 本間 研一 (北海道大学)
副委員長 柴田 重信 (早稲田大学)
総務 本間 さと (北海道大学)
会計 近藤 孝男 (名古屋大学)
財務 大塚 邦明 (東京女子医科大学)
広報 海老原史樹文 (名古屋大学)
顧問 高橋 清久 (精神神経センター)

○国際プログラム委員

Ken-ichi Honma (JSC), David Harper (SLTBR), Francesco Portaluppi (ESC),
Shigenobu Shibata (JSC), Rae Silver (SRBR), Yvan Touitou (FSC),
Dietmar Weinert (ISC), Hakan Zengil (SC-T)

○プログラム委員

本間 研一 (北大), 柴田 重信 (早稲田大), 大川 匡子 (滋賀医大),
井上 慎一 (山口大), 近藤 孝男 (名大), 岡村 均 (神戸大),
海老原史樹文 (名大), 大塚 邦明 (東京医大), 井深 信男 (滋賀大),
深田 吉孝 (東大), 富岡 憲治 (山口大), 本橋 豊 (秋田大),
石田真理雄 (産総研), 内山 真 (精神神経センター), 堀 忠雄 (広島大)
高橋 清久 (精神神経センター)

Constitution for a World Federation of Societies for Chronobiology

Article I

A World Federation of Societies for Chronobiology (hereafter called "The Federation") is hereby created and shall be governed by the present Constitution.

Article II

Purpose

The purpose of the Federation is to strive, in all countries, to promote education and the attainment of the highest level of knowledge and understanding in the field of chronobiology in so far as such activities shall be wholly non-profit making in nature. Chronobiology is defined as being all forms of study of the rhythmic phenomena in living things. Such studies may be pursued in bacteria, plant, animal and human, and be of experimental, clinical or applied nature.

To that end, but without restricting the foregoing main object of the Federation, and in so far as the same shall be wholly charitable, the Federation intends:

1. To foster and encourage scientific research, investigation and demonstration in the field of Chronobiology.
2. To improve the quality of in the professions dealing with these sciences.
3. To supply information to, to operate with and to advise , through its Committees, any society, institution or individual interested in these problems.
4. To establish and maintain an efficient collaboration with international and national learned societies, governmental organizations, professional associations and other groups and individuals who contribute to progress in the field of Chronobiology.

Article III

Means

The means of attaining these ends shall consist specifically of

1. Organizing a World Congress of Chronobiology to be held in one of the countries represented in membership of the Federation.
2. Appointing special Committees, Commissions, groups or individuals for the purpose of studying problems related to the aims of the Federation.
3. Fostering and facilitating, in all countries, the proper methods of study and means for action in the formal and informal exchange of ideas, concerning progress attained in Chronobiology.

4. Collaborating with the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, and with other Institutions, to the extent that they endeavor to improve human health in the field of Chronobiology.

Article IV

Address

The address of the head office of the Federation shall be that of the current Secretary-Treasurer.

Article V

Membership

The Federation is an association composed of National Societies, or groups of Societies, of Chronobiology. Societies applying for membership shall be accepted by majority vote of the Council of the current Federation.

Article VI

Governing Bodies

1. The Federation is administered by an Executive Committee composed of the President, the Vice-President and the Secretary-Treasurer. The Executive Committee will strive to hold the World Congress at place which is convenient to its members.
2. The Council is composed of one Delegate from each of the Member Societies. The Council selects by majority vote the President of the Executive Committee from Member Societies. The Council meeting will be held at the World Congress with the current President serving as chair.

Article VII

Voting

1. Each member of the Council has one vote in selecting President of the Executive Committee.

Article VIII

Fiscal Period

1. The Fiscal Period is defined as being from the end of one World Congress to the end of the next. This also defines the term of the Executive Committee.
2. The World Congress is held every four years.

Article IX

Congress

1. Not less than three years before the end of the Fiscal Period an Executive Committee

of the World Congress shall be set up for the purpose of organizing all aspects of the next World Congress.

2. The President of the Executive Committee has the option of being the Chairperson of the World Federation and also Council meeting.
3. The Chairperson of the World Federation shall set up the Scientific Program Committee together with one delegate from each of the member societies.

Article X

Finances

1. The expenses of the World Congress and federation office shall be referred to Executive Committee to devise strategies for covering meeting costs. Each Member Society will not be expected to cover the costs of the World Congress. It is expected that meetings will be supported by a combination of grants and registration fees. The Council will assist the President in applying for grants from industry and government to help cover the cost of the meeting.

Article XI

Amendment of Statutes

The present Statutes may be amended by a two-thirds vote of the Council committee.

Article XII

Current Statutes (Effective from June 2001, to September 2003)

Tentative President of Executive Committee: Dr. Shigenobu Shibata (shibata @human.waseda.ac.jp)

Secretary-Treasurer: Dr. Takao Kondo (kondo@biol1.bio.nagoya-u.ac.jp)

Chairperson of World Congress : Dr. Ken-ichi Honma (kenhonma@med.hokudai.ac.jp)

Member of societies for Federation (nine societies):

French Society for Chronobiology

European Society for Chronobiology

Israeli Society for Research and Medical Chronobiology

Society for Light Treatment and Biological Rhythms

Mediterranean Society for Chronobiology (MSC)

Japanese Society for Chronobiology

Society for Research on Biological Rhythms

International Society for Chronobiology

Chronobiology Society-Turkey

賛助会員リスト (50音順)

以下の団体（代表者）からは2002年度賛助会員として学会運営に御協力頂いております。お名前を掲載し感謝いたします。

岩井化学薬品 (株)	(岩井 廣行)
(株) 化研	(吉田 幸介)
光華産業 (有)	(越山 順一)
三協ラボサービス (株)	(椎橋 明広)
(有) シンワ科学	(上原 和敬)
(株) 薬研社	(鈴木 泰志)
ヤンセン-ファーマ (株)	(手塚 慎也)

時間生物学会事務局

第9回日本時間生物学会学術大会

会 期：2002年11月14日（木）、15日（金）
会 場：名古屋市中小企業振興会館（吹上ホール）
大会会長：太田龍朗（名古屋大学大学院医学研究科）

特別講演 (Prof. Rae Silver, SRBR President, Columbia University)
シンポジウム (1) 遺伝子発現と治療薬から見た体内時計研究
シンポジウム (2) 分子時計の解明とその展開
ワークショップ 時間薬理学—今日の課題 (仮)
ランチョンセミナー (千葉喜彦 前理事長)
ランチョンセミナー (高橋清久 現理事長)
一般口演、ポスターセッション
市民公開講座 (フォーラム)、などを予定しています。

執筆要領

原稿について

本誌では、投稿原稿を受け付けています。以下の執筆要領にしたがって原稿を編集局までお送りください。原稿の採用については、編集委員会が中心になって査読を行います。必要に応じて関連分野の専門家に依頼し決定します。

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）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¹⁻³⁾、・・・である。^{5,6,9)}
- 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, Gerecke 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、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

- ・ 前回の学術大会で企画された、新進気鋭の若手時間生物学者によるワークショップ「生物リズムの理論的基礎と多様性」を特集として組みました。講演内容をわかりやすくまとめていただき大変充実した内容になりました。御一読下さい。
- ・ 本誌では、投稿原稿を募集しています。投稿される方は、執筆要領にしたがって、原稿を編集局までお送り下さい。

日本時間生物学会会誌 Vol. 8, No. 1(2002) 平成14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