

## 目次

巻頭言 本間 慶蔵教授及び Juergen Aschoff 教授の思い出 登倉 尋實	1
第1回学術奨励賞受賞者論文 シアノバクテリアの時計研究の舞台裏 岩崎 秀雄	3
視交叉上核ニューロンにおけるサーカディアン細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度リズムの発見：その時間生物学におけるインパクト 池田 真行	12
総説 生体時計を基盤とする循環動態調節機構の解明 江本憲昭、野中英美、横山光宏	23
インターバルタイマータンパク質TIME、ねじまきPIN付き 甲斐英則、谷 直紀、磯部 稔	28
鳥類の時計遺伝子と光周性 安尾しのぶ、渡邊美和、海老原史樹文、吉村 崇	35
海外レポート アメリカでのポストドク生活—テネシー州ナッシュビルより 太田 英伸	41
第2回 Molecular Clock東京 2004 に参加して 渡辺 剛史	45
日本時間生物学会学術奨励賞公募のお知らせ	47
11回大会のおしらせ	48
事務局報告	49
執筆者のプロフィール	53
賛助会員リスト	55
執筆要領	56

本間 慶蔵教授及びJuergen Aschoff 教授の思い出

登倉 尋實

奈良女子大学名誉教授及び日本時間生物学会名誉会員

北大大学院獣医学研究科修士課程の学生に入学したのは、1965年4月であった。本間 慶蔵教授から魚の行動記録装置をつくり、魚の行動リズムの研究をするように指示された。既に先生は記録装置のアイデアを持っておられそれを具体化するようにとのことであった。その前に、先生はハイデルベルクのAschoff教授のもとに留学されておられ、その仕事の継続であった。不肖の弟子で、大学院在学中にその仕事を完成できなかった。また、獣医学部で家畜の生理の研究ではなく、なぜ魚の行動リズムなのかも絶えず疑問に思っていた。しかし、様々な文献を読むなかでリズム研究の深さが判ってきた。日本生理学会で魚のリズムの結果を話しても誰も興味を示さなかった。ヒトや種々の動物の行動リズムの研究ではAschoff教授の仕事が世界的だという事が、本間慶蔵教授の話や文献から徐々にわかり、いつかはAschoff教授のもとに留学したいという夢は膨らんでいた。本間 慶蔵教授の推薦もあり、アレキサンダー・フォン・フンボルト財団の留学試験に幸い合格し、Aschoff教授の主宰するマックス・プランク行動生理学研究so(当時、西独)に留学できることになった。世界中から多くの研究者が出入りしていた。スウェーデンからエリクソン博士が魚のリズムの研究のため留学していた。そこで過した1年10ヶ月間は私の人生で最も楽しい充実した時期であったように思う。ようやくリズム研究の広さとなぜ本間先生がこだわられた魚のリズムかということも判った。私は京都大学霊長類研究所でサル体温調節反応と行動リズムの研究を行い、サルの扱いに慣れていた関係で、Aschoff先生の下でもプタオザル、リスザルの行動リズムと光・温度の研究を夢中で行なった。私は留学した時には、奈良女子大学家政学部被服生理学講座の助教授になっていたが、被服とは全く関係ないサルの行動の観察に没頭していた。本間先生はその後も魚の行動記録装置の完成に情熱を持ち続け、その完成品を奈良まで札幌から持参され、奈良で続行するよう依頼された。さすがに、家政学部の被服生理学講座でおこなうことは躊躇され、幸い理学部生物学教室の大石 正助教授(当時)が生物リズムに多大の興味を持っておられたので、彼に本間式魚行動測定装置を使い魚のリズムの研究を継続してもらった。彼も後2年で停年であるが、その装置は実験室のどこかに保管されていると思う。本間先生の執念には深く頭がさがるし、先生がリズムの研究へ導いて下さったご恩は生涯忘れない。教師というものは、単なる知識ではなく、対象に激しい情熱を持っていることが、若い学生に言い知れぬ影響を与えることを本間先生の行動をとおして教えられた。本間先生に習い、私も多くの弟子にそのように接してきた。Aschoff先生は奈良に3度足を運ばれた。先生の父上、Ludwig Aschoff教授は優れた大病理学者で日本の多くの病理学者を導かれた方である。日本とも深い絆があり、奈良に関係したお寺があるので探して欲しいといわれ、大石教授がAschoff教授と私を彼の車にのせ、奈良のお寺をくまなく探し回り、漸く大安寺を探し当てた。そこにはLudwig Aschoff教授の写真、ゆかりの品々があり、Aschoff教授は大変喜ばれた。Aschoff教授のご子息、Andreasも大安寺を訪問された。この大安寺の発見が私が大石教授の助けを借りて、Aschoff教授にできた唯一の恩返しだったのかもわからない。お寺の住職(河野貫主)もいまは他界され、彼の骨の一部は、FreiburgのLudwig Aschoff, Juergen Aschoffのもとに運ばれるという。

Aschoff先生は奈良女子大学の人工気候室をみて、光がヒトの体温調節に与える研究を実施したらと私に薦めた。先生のこのアイデアは幸い優秀な院生に恵まれ大きく発展した。昼間の明るさの違いは、夕方、寒さに曝された際の着衣行動に影響を与えることが判った。最初は光の強さの違いが夕刻の寒冷時の着衣行動に影響することを誰も信じなかった。また、昼間の明るさの違いは、夜間や昼間の体温のレベルに僅かであるが、確実に影響を与えること、その根本は昼間の高照度は体温調節反応のセットポイント値を低下させることがあり、従って発汗開始や血流の変化と鼓膜温度の関係、寒冷感覚をも修飾することにつながり、それも証明した。ま

た、時間感覚も周囲の明るさの影響を受け、その根本にはセットポイント値の低下が関係すると考察している。体温調節反応だけでなく、胃腸管運動・消化吸収、尿量にも昼間の照度は確実に影響する。Aschoff先生 の一言が私の研究生活を大きく変えたと思っている。さらに、Aschoff 教授はサル在行动リズムに温度が与える研究を薦められた。当時は温度は恒温動物には影響を与えないと信じられていたが、温度サイクルは弱いけれども確実にサル在行动リズムに影響を与えることがわかった。この発見は大変な衝撃であった。その後、温度サイクルはヒトの体温リズムの振幅や位相を変化させることを若村 智子(4月以降、京大助教授、本学会評議員)が証明し、彼女の学位論文になった。これは衣服とリズムの研究に発展した。衣服を着るという事は、皮膚温度を変えることにつながる。温度がリズムに影響する以上、衣服も皮膚温度を介してリズムに影響する可能性もあると考えた。Shin-Jung Park (Sungkyunkwan大学、Seoul) は同じヒトが半袖シャツ・半ズボンを着用するか、長袖シャツ・長ズボンを着用するかにより、夜間前半の尿中のメラトニン分泌量が有意に異なり(半袖・半ズボンが大きい)、睡眠感も半袖シャツ・半ズボンのほうが良い。両衣服条件間で皮膚温度の挙動が大きくことなり、その違いがメラトニンに影響し、ひいて睡眠感を変えたと考察している。この仕事もAschoff教授のサル在行动リズムと温度の研究が最初のヒントになっている。被服とヒトのリズムの研究はまだ緒についたばかりである。それはマスクキングだとの批判の受けた。しかし、なにかあるという思いは消えない。残り少ない人生になってきたが、今後、この分野にエネルギーを注ぎたい。

本間 慶蔵教授とAschoff教授は深い友情に結ばれていたという。二人に共通していえることは、決して弟子を自分の意見で縛らなかった事と思う。しかし、多くの弟子は喜んで先生との共同研究を楽しんだ。私の周囲にもまだ、日本人、韓国人、中国人、ポーランド人の多くの研究仲間がいる。両先生がそうされたように、私もそのような関係で研究仲間との関係をつくり、研究生活を楽しみ生涯をまっとうしたい。色々の意味でお二人は私の研究人生に影響を与えた巨人であった。

## シアノバクテリアの時計研究の舞台裏

岩崎 秀雄

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

私たちが日常体験しているように、論文に掲載される内容は、研究活動のごくごく一部に過ぎない。私たちは、シアノバクテリアを用いて、概日リズムの基本機構に関する解析を行ってきた。研究の前提や意義などについては、最近いくつか総説や解説を書いたので、参照して頂きたい(岩崎、2002; 2003a, 2003b)。ここでは、その中で私が多少なりとも関与した5つの主要な論文(Ishiura et al., 1998; Iwasaki et al., 1999; Iwasaki et al., 2000; Nishiwaki et al., 2000; Iwasaki et al., 2002)が、どのような経緯で発表されるに至ったか、できるだけ論文に書いていないエピソードを中心に話したいと思う。この作業を通して、私がどのような失敗を積み重ねてきたか、さらに、私の研究の経過に、共同研究者・競争研究者がいかに重要であったかを確認したい。

### 1. シアノバクテリアの時計遺伝子群 *kai* の同定 (Ishiura, Kutsuna et al., 1998)

この論文は、シアノバクテリアを用いて初めて原核生物の時計遺伝子群 *kaiABC* を同定したものである。私はM1の学生として、この同定作業のごく最終段階に部分的に関与させていただいたのだが、それが私のシアノバクテリアの時計研究の第一歩となった。

私が生物時計の研究に興味を持った、いささか風変わりな理由は最後に述べるとして、近藤孝男・石浦正寛グループに参加したのは幾つかの偶然が絡んでいる。大学3年生の頃、生物時計の総説や本を眺めていた時、『植物細胞工学』という雑誌で生物時計の特集号(1991年)があり、その中に近藤先生(当時、岡崎基生研)の書いたウキクサのリズムの総説もあった。そのほか、後藤健先生(帯広畜産大)、中島秀明先生(岡山大)による総説も大変印象的で、とくに後藤先生の仕事(代謝サイクルやセカンドメッセンジャーを核とするリズム機構の考え方)に大変興味を惹かれた。ざっと御略歴を見たところ、三人の先生とも名大理学部出身と気付いた。当時私が在籍していた名大農学部農学科には、懇意にしていた理学部出身の手塚修文先生(植物生理学)がおら

れた。早速問い合わせしてみたところ、手塚先生も同じ研究室の出身だという。早速手塚先生は近藤先生に連絡をとってくださり、私は、軌道に乗りはじめたシアノバクテリアの研究をそのとき初めて知った。近藤先生らのシアノバクテリアの最初の論文(Kondo et al., 1993, PNAS)が掲載される直前のことであった。近藤先生には、1993年の10月、名古屋での生物物理学会の際にはじめてお会いした。学部4年の時は、昆虫内分泌学で有名な山下興亜教授の研究室に配属し、カイコの細胞周期関連因子の分子生物学的な研究に参加させていただいたが、それは大学院から近藤先生のグループに参加することを前提とした選択だった。

実際に大学院(名大人間情報学研究科)に入った1995年当時、近藤-石浦グループは岡崎の基礎生物学研究所から名古屋大学理学部に転任したばかりだった。引越しが終わる秋口まで、連日岡崎に通って実験をした。当時は、まだグループは小さく、近藤・石浦両先生とともに、京大の博士課程(D3)の青木撰之さん、名大の先輩(D1)の沓名伸介さんが主力メンバーとして研究をしていた。沓名さんと私は、近藤先生による素晴らしい生物発光測定システムとスクリーニング系で得られた長周期変異体(P48と

E-mail : iwasaki@bio.nagoya-u.ac.jp

呼ばれていた)を相補する、ゲノム断片の相補領域の限定と、塩基配列の解析を行った。変異体の相補実験に用いられたゲノムライブラリーは、石浦先生の洗練された実験デザインによるもので、実際の作製には青木さんがあつた。さて、P48の相補領域を含む約5kbの領域を、私たちはP48領域と名付け、そこに含まれる8つのORF(読み取り枠)を仮に遺伝子A~Hと名付けた。1995年の夏休み中、杓さんと私は最終的な遺伝子領域約2kbに絞りこみ、3つの遺伝子からなる時計関連遺伝子クラスターを同定することが出来た。これらはP48領域のD, E, F遺伝子であったことから、それ以降しばらく学会等ではD, E, F遺伝子の名で報告していた。これらの遺伝子はまったく新規の遺伝子で、コードするアミノ酸の配列から機能をまったく推定できなかった。いまだに真核生物に相同遺伝子は見つかっておらず、生化学的機能は未解明である。

さて、これらの遺伝子の特定後、二つのプロジェクトが立ち上がった。一つは転写レベルの解析で、石浦先生の指導の下、杓さんが遺伝子破壊、過剰発現、転写活性の測定など、一連の基礎的な仕事を精力的に行なった。ここから、D, E, F遺伝子(のちの*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*遺伝子)がそれぞれ概日遺伝子発現に不可欠なことで、*kaiB*と*kaiC*がオペロンを構成してリズムミックスに発現すること、*kaiC*を過剰発現すると*kaiBC*プロモーター活性が強く抑制されること、*kaiA*不活化株では*kaiBC*発現が著しく低下することなどが次々と明らかにされた。ここから、KaiC蛋白質による自身の転写抑制(ネガティブ・フィードバック制御)を自励振動の本質とするモデルが考案されることになる。しかし、後述するようにこの解釈には若干問題点もあり、それほどすんなりと出てきたわけではなく、むしろ近藤先生・石浦先生中心に論文作成の段階で練り上げられていったものと記憶している。ともあれ、そのモデルは、初期のショウジョウバエのPer蛋白質による*per*遺伝子発現の抑制、アカバシカビのFrq蛋白質による*frq*遺伝子発現の抑制などと基本的に同様の「単純ネガティブ・フィードバック・モデル」であった。

さて、時計遺伝子同定の初期の結果は95年の名古屋での時間生物学会や、札幌シンポジウムなどで報告されたが、当初は仮の名のDEF遺伝子として発表した。むろん、ネーミングは重要な課題(というより楽しみ)だったから、色々なアイデアが出た。*jikan(jik)*は、個人的にはかなり好きな候補だったが、石浦先生の「俺は濁音は好かん」との一言で却

下。*toki*や*ritsu*はショウジョウバエの変異体の名前として使われていたので、残念ながら使えない。「すべては響である」という仏教の教えから*hibiki*というアイデアも青木さんから出されたが、採用にはいたらなかった。そのほか、*chronos*, *central oscillator (cos)*, *master oscillator (moc)*なども出たが、「折角だから日本語にしよう」という意見で一致した。その中で一旦合意を見たのは*wakka*(輪っか)だった。サイクルの輪にひっかいたこのネーミング、ほのほのとした、なかなか味のある可愛い名前で、例外的に相談した5人の全員一致を見た。ところが、念のため石浦先生が、共著者の一人のCarl H. Jonson(Vanderbilt大)に問い合わせたところ、「wackyというスラング(意味は辞書を見て下さい)を連想させるから頼むから辞めてくれ」とのこと。泣く泣くあきらめざるを得なかった。*kaiten*(回転)も有力な候補だった。この名前は、96年のSRBRでの石浦先生の発表で初めて用いたが、その際も飽くまで仮の名前のつもりだった。ところが、その年にJay C. Dunlapが彼の総説にシアノバクテリアの時計遺伝子の名前を*Kai*と紹介してしまった(Dunlap, 1996)。しかも、もともと*kai*は*kaiten*の短縮形の通称のつもりだったが、いつの間にか*kai*自体がフルネームになった。かくして、DEF遺伝子は、それぞれ*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*となった。*kai*という名称については「実はKondo And Ishiuraの略なのではないか?」という噂が飛び交ったのだが、少なくとも身近にいた私でも、それを肯定する発言を両先生から聞いたことはありません、念のため。なお、Carl Johnsonは「*kai*という名前自体は賛成だが、間違っって欧米人にKay(ケイ: Steve A. Kay)と発音されたらたまらん」という冗談まじり(?)の意見をよこしてきたが、その進言は却下させて頂いた(ただし、海外で講演する際、「ケイと発音しないように」という言葉でしばらくはウケをとることができた。Steve本人にも大ウケだった)。

最終的に*kaiABC*という名称が確定されたのは、論文をまとめる段階だった。1998年に*Science*に掲載されるまでには、相当時間がかかり、そのエピソードも沢山あるのだが、そのいきさつについては省略しよう。ただし、その間、程らによる*mPer1*のクローニング、Takahashiらによる*Clock*のクローニングという哺乳類時計遺伝子の同定とそれに続く急速な展開が、私たちの活動にも大きな意味と影響をもたらしたことを記しておかねばならない。なお、程さんのクローニング情報が、分子生物学会の英文要旨を

通じて海外に伝わったのを受け、Joe TakahashiとMichael Rosbashから近藤先生に直ちに問い合わせが入ったことも思い出深い。

なお、同定作業を行なった岡崎にはSusan Golden (Texas A&M大学) のところから、ポストクのCarol Anderssonが訪れ、3ヶ月ほど共同実験も行なった。英語の訓練にはまたとない機会、最大限利用させて頂いたことが、その後外国人研究者たちと知り合ったり議論したりする上で大変役に立った。なお、名古屋に移ってしばらくしてから、近藤・石浦両先生と杓名さんと私の4人でディスカッションしていた時、話の流れで光周性の分子遺伝学的な解析として、ウキクサを用いた解析をはじめたらどうか、というアイデアが一気に持ち上がったときの熱気も忘れられない。このプロジェクトは、数年後に実際に近藤研で開始され、現在助手の小山時隆さん、院生の三輪久美子さんを中心に活発に展開されつつある。

## 2. Kai蛋白質の相互作用とタンデム構造 (Iwasaki et al., 1999)

さて、*kai* 遺伝子クローニング後の転写レベルの解析と並んで始まったプロジェクトが蛋白質レベルの解析だった。とは言え、Kai蛋白質はまったく新規の蛋白質で、ATP結合モチーフ以外にこれといった特徴もホモログも見いだせなかった。そこで、とにかく当時流行りの酵母Two-hybrid系を用いて相互作用パートナーを探索しようということになり、私が担当することになった。最初に取り組んだのは、Kai蛋白質間で相互作用があるかどうかの検討だった。遺伝子クラスターを作っていることからして、その可能性があった。さらに、当時は、1994年にPer:PerホモダイマーがRosbashのラボから報告され、1995年にWeitzらがPerの相互作用因子としてTimを同定するなど、時計因子の蛋白質間相互作用に焦点が当てられつつあった時期だった。当時はバクテリアでTwo-hybridを用いた報告はほとんどなく、かなり不安なスタートだったが、Weitzの論文等を参考にして、比較的すみやかにポジティブな結果を得ることが出来た。In vitroの転写翻訳系を用いた相互作用アッセイや、Kai蛋白質の抗体作りなど、ごくごく基本的な生化学的な実験もラボとしては初めてで、今思うとずいぶんまごつきながら実験していたものである。いずれにしても、KaiA, KaiB, KaiCはあらゆる組み合わせで相互作用できるらしかった。しかし、KaiA-KaiB間の相互作用は非常に弱

かった。そこで、KaiCをアッセイ系に添加することでKaiA-KaiB間相互作用が促進された。つまり、どうやらKaiA, KaiB, KaiCは三成分からなる高次複合体を形成できるらしい。折しも、ショウジョウバエの*per*<sup>+</sup>変異によるPer:Per間、Per:Tim間相互作用異常の報告もなされ、私もそれまでに得られた30種類近くの周期変異の蛋白質間相互作用への影響や、相互作用ドメインを調査することにした。この研究には、途中から院生の谷口靖人さんが加わった。

さて、1996年ころから、次第にバクテリアの全ゲノム配列の解読が報告されるようになった。そこで、当初は配列が出るたびに熱心にKai蛋白質の相同蛋白質の検索をしたのだが、なかなか見つからない。最初に「KaiCに部分的に似てるかも...」と思われたのは、*Methanococcus*という、メタン菌(古細菌)のゲノム中にあったMJ1359という機能不明のORFにコードされる蛋白質だった。しかし、サイズはKaiCの半分しかなく、どうも自信が持てずにいた。そこで、ともかく配列比較を試してみたところ、KaiC蛋白質の前半部分に低い相同性があるようだった。ATP結合ドメインの位置もよく対応している。では、KaiCの後半部分は何かに似ているだろうか? 後半部分だけを相同検索したところ、またしてもMJ1359がヒットした。しかも、ATP結合ドメインはまたも対応する位置にある。...ということは、KaiCは前半と後半が似ている重複構造をとっている! この基本的な構造に気付くまで、配列が出てから1年以上かかった。その後、古細菌ゲノムの中に単一ユニットのみの*kaiC*相同遺伝子と、重複構造をとる相同遺伝子が次々と見つかった。また、*kai* 遺伝子の相同遺伝子はシアノバクテリアのゲノム中には一般的に存在するが(持っていないものも最近見つかった)、大腸菌をはじめとする他の多くの真性細菌や真核生物には見つかっていない。こうしたことから、*kaiC*はもともと古細菌で生じたものが重複し、その後シアノバクテリアにとりこまれたのではないかと推測をした。

こうしたことをまとめて論文にしたのだが、いつものように論文の作成は遅れ気味だった。そうこうしているうちに、Carl JohnsonからBRET (bioluminescence resonance energy transfer) という新たな手法を使って、KaiB間相互作用を確認した、との報告を直接聞いた。むろん私たちの結果を受けて行った実験である。しかし彼等は書くのが早い。原稿の内容をめぐって一悶着あったが、調停を重ね、無事に私たちはEMBOJに (Iwasaki et al., 1999)、彼等

のほうはアッセイ法の開発という趣旨で *PNAS* に論文を掲載することができた (Xu *et al.*, 1999)。Kai 蛋白質同士の相互作用の研究はその後も展開し、院生の景山伯春さんの並々ならぬ努力の結果、最近では 500 kDa 以上の巨大な複合体が夜間に形成されることが示されている (Kageyama *et al.*, 2003)

### 3. SasA の同定と解析 (Iwasaki, Williams *et al.*, 2000)

Kai 蛋白質の結合因子の探索は、1997 年頃から始まった。酵母 two-hybrid 系を用い、私がゲノムライブラリーを作製し、谷口さんがスクリーニングすることになっていた。しかし、私の作ったライブラリーには致命的なコンタミネーションが見つかり、谷口さんの数カ月の努力が水泡に帰してしまう事件が起こってしまった。大いに落胆する谷口さんを見て、私はこれ以上研究を進める自信がなくなり、もう大学院を辞めようと真剣に悩んだが、続けることにしたのは、近藤先生をはじめ周囲の暖かい励ましがあったことだった。谷口さんも、くじけず方針転換し、KaiC の二つの KaiA 相互作用領域を限定し、その変異の効果を論文にまとめることが出来た (Taniguchi *et al.*, 2001)。結局、谷口さんの卒業後に新たなゲノムライブラリーが完成、スクリーニングしたところ、KaiC の相互作用因子候補として、SasA (*Synechococcus* adaptive sensor A) と呼ばれる既知の情報伝達系のヒスチジンキナーゼが釣れてきた。このスクリーニングには、修士の北山陽子さんが尽力してくれた。彼女はその後 Kai 蛋白質の細胞内動態や (Kitayama *et al.*, 2003)、さらに新たな Kai 結合蛋白質の分離、2 波長生物発光同時測定系の開発など、多方面で顕著な成果をあげることになる。

さて、SasA は、奇遇にも名大農学部の水野猛・饗場浩文先生のグループが 1993 年にクローニングした、機能不明のヒスチジンキナーゼだった。面白いことに、シグナルを受容するセンサードメインは KaiB と相同性があり、KaiC との相互作用に十分だった。機能解析のため、饗場さんから *sasA* 領域を含む遺伝子断片を頂き、欠失や過剰発現用のコンストラクトを作った。いよいよ機能解析にとりかかろうとした時 (*sasA* を釣り上げてから 3 ヶ月後)、饗場さんから「Susan Golden のところのポスドク (Stan Williams) から、同じクローンを送ってくれと言って来たから送っておいた」と伝えられ、いざさか焦った。とにかく欠失株を解析したところ、*kaiBC* 遺伝子の発現レベルが劇的に低下し、発現リズムも見

かけ上まったく無周期になっていた。少なくとも時計に大きな影響があることは間違いない。そこで 1998 年の 8 月上旬に Susan に連絡を入れ、無駄な競争をしなくてすむよう協力を持ちかけた。一応、今後の実験予定だけ説明し、できるところは協力しようということになった。私は 1999 年の 2 月までに、欠失実験、過剰発現実験など、基本的な実験を済ませ、「SasA は概日リズムの必須因子であり、KaiC と相互作用するとともに、*kaiBC* の発現の正の調節因子である」という内容でまとめようと考え、早速詳細を Susan に送り、打診した。その返事で初めてわかったのだが、Stan は、実験で SasA に行き着いたのではなく、KaiB の相同遺伝子検索から SasA を見つけていた。彼はもともとバクテリアの二成分情報伝達系の仕事をしていたことがあり、SasA を「KaiB 様配列 + ヒスチジンキナーゼドメインの融合蛋白質」とにらんだのだった。その間、彼等のほうでもいくつか実験をしていたが、彼等のデータでは、*sasA* 欠失株は確かにひどく振幅が低下するものの、リズム成分は確認可能だという。また、こちらでもやりかけていた蛋白質レベルの解析にも着手しつつあるようだった。とりあえず、私は *sasA* 破壊株の表現型の齟齬のチェックに当面専念すること、株をお互いに交換して相互にチェックしてみることに、SasA の蛋白質レベルの解析は Stan に任せること、などを提案した。3 月上旬には私も「低振幅のリズム」を捉えられるようになった。原因は光照度だった。光が比較的強ければ、*sasA* 破壊株のリズムはなくなるが、低照度ならば、かろうじてリズムを確認できた。さらに、その周期は数時間短くなっていた。SasA を「必須の時計因子」とする間違っただけで済んだのは、Susan や Stan と組んで双方でデータをとって確認することができたからだ。つくづく共同研究者は有り難い。私は 3 月下旬にテキサスに飛び、数日間 Stan, Susan と顔を突き合わせてデータを検討し、今後のプランを練った。

最終的に、SasA は基本振動発生の必須要素ではないが、破壊されると振動が不安定化し、周期短縮することから、おそらく基本振動の増幅・安定化に寄与する circadian amplifier である、と推察された。この際、KaiC からの入力と、*kaiBC* 発現を正に調節することを考えると、基本ループに対して二次ループを形成することになる。また、破壊株は明暗サイクル下で (*kai* 遺伝子群とは無関係に) 増殖阻害を示したことから、代謝、光、時計のリンクに位置する因子としても興味深いものであった。課題は多く残

されたが、得られた結果には新規性があり、StanがCell誌を狙ったらどうか、と提案してきた。私は、Genes & Development誌あたりが妥当と考えていたが、ほだされてCellに投稿したのは1999年の年末だった。途中、学位論文の提出などもあったが、いい意味で大変頑固者で妥協の効かないStanと論文を仕上げるには驚くほど根気と忍耐と努力が必要で、結局投稿した頃原稿は“version 37”にまでなっていた。3人のreviewerの要求は非常に厳しいものだった。そのうちの一つは、掲げられたモデルを「よりファインに」する実験と説明を要求するものであり、科学論文の妥当なチェックというpeer reviewの本質を超えて、査読者・編集者に誘導される形で論文修正をする際の問題点や危険性も感じた。訂正稿で掲げたモデル図は、(どちらかといえば)その場しのぎのアクロバティックな説明を無理矢理ひねりだした点がないにしろあらずで、最終的にアクセプトされたのは嬉しかったが、個人的には忤怩たるころもあった(Iwasaki *et al.*, 2000)。SasAの研究は、その後Stanが新たに立ち上げたユタ大学のラボと私たちのラボで続けられている。

#### 4. KaiCのリン酸化に関する研究：その1 (Nishiwaki, Iwasaki *et al.*, 2000)

KaiC蛋白質の細胞内動態に関して最初に取り組んだのは、ウェスタン解析で量的変動を追うことだった。酵母two-hybrid系の立ち上げの頃から、抗体を作り、解析をはじめていたが、*kaiBC*プロモーターの顕著なリズムに比べ、Kai蛋白質の動きはひどく緩慢で、1年間以上まったくリズムを検出できなかった。一時期、私は「蛋白質レベルの蓄積リズムがほとんど検出できないにも関わらず、転写レベルのリズムははっきりと出る」という“事実”を報告すべきだ、とさえ主張していた。しかし、ある時Carlから「こちらではKaiCの蓄積にもリズムが確認できた」と連絡を受けた。私が実験条件を最適化できていないせいと思え、とても有能なポストドクの西脇妙子さん、院生の富田淳さんに条件を変えていろいろ試していただき、私たちのラボでも蓄積リズムが検出できるようになった。「蓄積リズムなし」との結果を公表せずに済んだのは幸いだったが、冷や汗ものだった。ここでも私は共同研究者に大いに救われた。

当時、1994年のEderyらによるPer蛋白質のリン酸化リズムの発見、1997年のアカパンカビのFrq蛋白質のリン酸化リズムの報告から間もなかったため、Kai蛋白質にもそうした修飾がないものかと考えた

のは自然の成り行きだ。それに、Kai蛋白質の生化学的な機能がまったく推定できなかったため、とにかく何でもいからとっかかりが欲しかったのである。私は主として相互作用と蓄積パターンに集中し、西脇さんがリン酸化の有無を調べることにした。西脇さんは、KaiCがSDS-PAGE上で複数のバンドとして分離でき、移動度の遅いシグナルはリン酸化によること、さらにKaiCのリン酸化に顕著なリズムがあることを見いだした。彼女はさらにKaiCが実際にATP結合蛋白質であることを明らかにし、ATP結合部位の変異体の解析などを行った。当初の標的は、KaiCがATPase活性を持つかどうかだったが、そちらのほうは思うような活性はなかなか得られなかった。

その頃私はSasAの機能解析をしていたが、KaiC共存下でSasAキナーゼの自己リン酸化活性が変化するかを調べたところ、まったく予期しない結果が得られた。1998年の10月末のことである。コントロールとして大腸菌内で合成・精製したKaiC融合蛋白質にATPを加えただけで、リン酸基の強い取込みが見いだされたのである。つまり、KaiCは自己リン酸化能を持つ。これは、ATP結合能とともに、KaiCで見いだされた最初の生化学的な性質であった。さらに、化学安定性実験から、リン酸化残基はセリンまたはスレオニンと推察された。バクテリアでは、真核生物と異なり、ヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸化の報告例が遥かに多く、一般的である。KaiCには既知の真核型のキナーゼドメインは存在せず、シアノバクテリアでは最初のセリン・スレオニン自己リン酸化蛋白質の報告例になった。西脇さんはKaiCのATP結合能に関する論文を準備中であった。KaiCが自己リン酸化活性を持つということに関して、私はもっといろいろ調べるつもりもあったが、あまり発表が遅くなるとはいけないし、西脇さんのPNASの論文にこのデータを載せて頂くことにした。ただし、この時には*in vivo*でのリン酸化の話には言及せず、飽くまでATP結合能と、*in vitro*での自己リン酸化に関する論文となった(Nishiwaki *et al.*, 2000)。

#### 5. KaiCリン酸化の話：その2 (Iwasaki, Nishiwaki *et al.*, 2002)

偶然*in vitro*のKaiCの自己リン酸化活性に気付いてから、SasAの解析を続けつつ、KaiAやKaiBによる自己リン酸化活性への影響を調べてみた。私の当時のアッセイではKaiBの効果はまったく見られな



ったが、KaiAの添加により、KaiCの自己リン酸化が著しく上昇することがわかった。明らかにKaiAのKaiCに直接なんらかの作用を及ぼしている。

SasAの解析にある程度目処が経つのと同時に思いついた別の課題は、Ishiura *et al.* (1998)のモデルの妥当性を検討することだった。前述の通り、当時のモデルには問題点があった。KaiCは単純に自己抑制因子とされていたが、*kaiC*欠失株では決して*kaiBC*プロモーター活性は上昇しない。むしろ平均以下のレベルであった。いっぽう、アカパンカビの自己抑制因子Frqの場合、*frq*遺伝子破壊は*frq*遺伝子プロモーターの劇的な上昇をきたす。KaiCが抑制因子と考えられたのは、欠失実験ではなく、副作用の起こりかねない過剰発現実験で*kaiBC*プロモーターが強く抑制されたためだった。この点は、注意よく読めば*Science*の論文にも言及してあるが、どちらかといえばマイナーな問題点とされていた。私はそれがいささか気になった。また、Kai蛋白質同士の相互作用やKaiCのATP結合能・自己リン酸化能という蛋白質レベルの観察と、転写リズムの自己制御をどのように絡めるのかも見通しが立っていなかった。ともかく、*kai*遺伝子同士の遺伝学的な関係をもう少し検討してみようと思った。そこで、*kaiA*、*kaiB*、*kaiC*それぞれの機能欠失株で*kaiA*または*kaiC*遺伝子を過剰発現させ、*kaiBC*プロモーター活性をモニターした。野生株で*kaiC*過剰発現を行うと、*kaiBC*プロモーターは強く抑制され、リズムが停止される。*kaiA*不活化株でこの実験を行うと、*kaiBC*プロモーターはむしろ緩慢に上昇する結果が得られた（ただし、*kaiA*不活化株自体の*kaiBC*プロモーター活性はもとから低く抑えられている）。逆に、*kaiA*を野生株で過剰発現すると*kaiBC*プロモーターの活性は上昇し、無周期化するが、この実験を*kaiC*欠失株で行うと、*kaiBC*プロモーター活性はまったく変化しなかった。以上の結果から、KaiAとKaiCは協調的にポジティブにもネガティブにも働くと示唆された。むしろ、これはかなりトリッキーな実験である。過剰発現実験は、本来ありえないレベルに特定の蛋白質が増えたことに依存する、異常な攪乱を起こしかねない。したがって、この種の実験はごく限られた範囲内で解釈の参考にする程度が望ましい。しかも、この実験を変異株で行うのだから、二重に注意が必要だ。いずれにせよ、*kaiA-kaiC*間相互作用を裏付けるデータは遺伝学的スクリーニングからも得られた。以前、*kaiA*と遺伝学的に相互作用しうる因子を特定するため、*kaiA*上の長周期変異株*kaiA2*の変異を抑

圧する変異株（サブレッサー）をスクリーニングしたことがある。周期が野生型に戻ったその変異は、*kaiC*遺伝子上に見つかった（*kaiC15*）。

次に、細胞内でのKaiCリン酸化状態を、様々な時計変異株で検討したところ、*kaiA*不活化株ではリン酸化型KaiCの蓄積が見られない。逆に、*kaiB*不活化株ではリン酸化KaiCの過剰蓄積が認められた。したがって、*in vivo*でもKaiAはKaiCリン酸化に重要と考えられた。また、面白いことに*kaiA2*変異株ではKaiCのリン酸化レベルが低下するが、*kaiA2kaiC15*二重変異体（周期サブレッサー変異株）ではリン酸化レベルが回復されていた。

私達は、以上の結果を論文にまとめることにした。その際、西脇さんによるKaiCのリン酸化リズムの報告も前提として入れさせて頂いたので、この論文では西脇さんはco-first authorになってくれた。しかし、KaiCのリン酸化に関する論文は、シアノバクテリアにしては厳しい競争の中で作成された。KaiCの自己リン酸化に対するKaiAの効果は、事前にS. GoldenやC. Johnsonに伝えてあった。KaiBについては、GoldenのところのStan WilliamsがKaiAの効果（KaiCリン酸化促進効果）に対して抑制的に働くとの結果を出した。そこで、StanらはKaiBの効果も含め、*in vitro*のリン酸化の性質と、KaiAの部分NMR解析情報とカップリングさせた論文を準備した。本来、その内容は私たちが論文の作成について事前協議したスケジュールや内容とは異なっていたが、彼等はそれを先に*Science*に投稿した（私達の論文作成の遅れも重大な一因）。それを聞いて私達も、同時掲載の可能性を求めて（KaiBの解析結果も加えて）*Science*に投稿したが、残念ながら両者とも却下された。そこで、私達はKaiBの解析部分を外して*PNAS*に投稿し直し、彼等もそれに続き、無事両者とも同じ号に掲載された（Iwasaki *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002）。この間KaiBの解析を主に行っていた北山さんには、内外の調整に巻き込む形で随分迷惑をかけてしまった。彼女の素晴らしい粘りと周囲のサポートもあり、*in vivo*、*in vitro*の解析に加え、Kai蛋白質複合体形成や局在性に関する検討を踏まえたKaiB中心の論文が*EMBO J.*に掲載できたのは本当によかった（Kitayama *et al.*, 2003）。

この間、Johnsonラボもリン酸化に関する研究を遅れて開始し、論文を整備できる段階になっていた。リン酸化に関する限り、内容はすでに私達やStanの結果と同様だったが、彼等はそれにKaiC蛋白質の安定性や、ゲノムワイドな転写調節の話を含めて、よ

り大きな論文にまとめあげた。後者は、KaiCの特定のcisエレメントは必ずしも振動発生に必須ではない、という重要な内容を含んでいた。それについては、私達のラボでも彼らと情報交換しつつ、ポストドクの中平洋一さんを中心に研究が進行していた。結果的には協議や言い合いをしつつ、彼等の論文は2003年のEMBOJに (Xu *et al.*, 2003)、私達の論文は別の観点からの実験結果も加えて2004年にPNASに掲載された (Nakahira *et al.*, 2004)。この経緯の詳細は省くが、一悶着も二悶着もあった。さまざまな思惑が複雑に絡み合い、大量のシビアなメールのやりとりをしながら調整にあたり、少なからず消耗・辟易し、まだなかなか整理のつかない問題点について、いろいろ考えさせられた。そのいっぽう、Johnsonグループの優秀なポストドク、Tetsuya Mori (盛徹也さん) とは、とても有益な情報交換を行うことができ、感謝している。

その後の私達のグループの研究の流れや概要については、最近書いた総説 (岩崎, 2003a) を参照して頂きたい。現在では、現行の真核生物での転写翻訳フィードバックモデルから、さらに大きく逸脱した概日発振機構の可能性が検討されつつある。それについては、近い将来機会を改めて報告させて頂きたい。シアノバクテリアのリズム研究は、KaiCの生化学的機能や周期決定機構、ゲノムワイドな転写調節の機構など、まだまだ課題が多く、未解明の重大な謎がたくさん残されている。その解明は、多くの意外な事実の発見と、興奮と感動に満ちたものになるはずだ。

#### 終わりに...

まず、私が行ってきた研究には、以上述べたように、多くの共同研究者の協力が当然ながら不可欠だった。また、研究や論文作成の大半が、内外の共同研究グループ・半競争グループの進捗状況に依存しつつ、研究室内部の事情も絡む形で発表にこぎつけたものであった。その間、私自身は共同研究者たちに迷惑をかける側面もずいぶん多く、反省すべきことが多かった。上に書いたこと以外にも、原稿のチェックや追試の遅れ、並行して行うべきラボの事務・管理や実験指導の怠慢、海外の共同研究者の立場とラボの研究メンバーの立場の違いをうまく調整仕切れなかったこと、研究テーマの割り振りで一部不満を招いてしまったことなど、山のように不手際があった (今でも多分ある)。その中でも、これほど充実した研究を共有する機会を与えてくれた彼女

ら、彼ら (ここにはお名前をあげることの出来なかった多くのラボメンバー・共同研究者・関係者も含めて) に、心からお礼とお詫びを申し上げたい。世界的にも珍しくシアノバクテリア研究者人口が高く、日本有数の生物リズム研究密度を誇る名古屋大学の研究環境にも感謝である。

大学院在籍中から心掛けたことは、内外の研究者とできるだけフランクに議論し、幅広く情報交換することと、若手の研究者・院生と連絡をとりあうことだった。今でも、吉村崇さん (名大)、松本顕さん (九大)、上田泰己さん (理研)、八木田和弘さん (神大・名大) などには特に日頃から議論や相談にのって頂いている。こうした若手の交流には、近藤先生をはじめシニアの大御所の方々、有能な中堅の研究者の方々の暖かいご理解が不可欠だった。たとえば、研究室を気楽に訪問させて頂いたり、若手交流会 (犬山, 1999年)、学会での若手シンポジウム (山口, 2001年) の後援など、大変好意的に支援して頂いたりしたことは、私達若手にとって大きな励みで、大変ありがたかった。

さて、ここに書いたことは私の立場から見た、限定された記憶とメモによる、意図のあるなしに関わらず限定されたスケッチに過ぎない。しかし、自然科学の研究は、主観と思惑と日常のせめぎあいの中で、そのときどきの条件に依存しながら冷静かつ熱っぽく進行する。たとえ導き出されたデータや解釈が単純明快であっても、そこには常にさまざまな事情が複雑に入り組んだ背景がある。自然科学が社会的に無視し得ない重みを決定的に増し続けている現在、そうした背景からどのように科学的成果がもたらされ、社会的に伝達・受容され、淘汰されていくのかを冷静に把握することは、現代の人間や社会の営みのダイナミクスを考える上で極めて重要である。私はそこに、科学と市民社会、文化や思想をつなぐ (あるいは既に繋がれている) 様相やヒントを垣間みることも期待している。

時間生物学は極めて多義性/多様性に富み、ダイナミックな領域 (ディシプリン) として展開してきた。私たちは生命のリズムをどのように面白がり、大切に思い、情熱を傾けてきたのか。さらに、この分野が扱う内容が、自然科学以外の周辺領域とどのように関わり、影響を与えあってきたのか。実は、私の時間生物学の研究に参入したのは、もとはといえば、このような「時間・生物・生命・リズムをめぐるって交わされてきた考え方や周辺領域を、科学史・文化史の問題系として捉え直すこと」への科学

論 (Science Studies) 的な興味に基づいている。その興味は、大学2-3年生のときに「生物時計」という概念を初めてまともに聞いた時にはじまり、ますます強くなるばかりである。時間やリズム、時計といった内容を扱うゆえに、時間生物学には周辺領域との独特の接点があり、その隣接領域は狭義の自然科学の範疇を遥かに超えている。真の意味で文理の枠を超えた融合型研究に適した境界条件を、この分野が必然的に備えていることは間違いない (この点、山口大学の時間学研究所が、時間生物学を柱の一つとして取り込む形で新たに設立されたことは素晴らしい)。こうした条件を注視し、理解を深めながら、今後の研究を模索・展開していきたいと思っている。そこでは、高度の科学研究の理解を前提として、自然科学に限らぬ他分野との対話・リベラルアーツの積極的な理解がより重要になってくるだろう。関連して、生命誌研究館に依頼されて昨年書いた小文がweb上で公開されている (岩崎, 2003b; 2003c)。ご意見・ご批判を頂ければ幸いです。

#### 参考文献

Dunlap, J.D. (1996) Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 30: 579-601

Iwasaki, H., Taniguchi, Y., Ishiura, M., Kondo, T. (1999) Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *EMBO J.* 18: 1137-1145

Iwasaki, H., Williams, S., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S.S., Kondo, T. (2000) A KaiC-interacting histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillations in cyanobacteria. *Cell*, 101: 223-233

Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., Kondo, T. (2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 15788-15793

岩崎秀雄 (2002) 「シアノバクテリアの概日リズムの発振機構について」 *日本時間生物学会誌* 8 (1) : 5-10

岩崎秀雄 (2003a) 「シアノバクテリアの概日リズム制御研究の新展開」 *細胞工学* 22 (12) : 1309-1314

岩崎秀雄 (2003b) 「時を刻むバクテリア」 (3節「生命と時計」をめぐる歴史) : *生命誌ジャーナル*, web版 [http://www.brh.co.jp/experience/exhibition/journal/37/research\\_21.html](http://www.brh.co.jp/experience/exhibition/journal/37/research_21.html)

岩崎秀雄 (2003c) 「生物時計と歴史」、*生命誌研究館HP*, コラムの庭 <http://www.brh.co.jp/salon/column/msg.php?89>

Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.H., Kondo, T. (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 281: 1519-1523.

Kageyama, H., Kondo, T., Iwasaki, H. (2003) Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.*, 278: 2388-2395

Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2004) Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 881-885.

Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., Kondo, T. (2000) Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 495-499

Taniguchi, Y., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Iwasaki, H., Kamagata, K., Ishiura, M., Go, M., Kondo, T. (2001) Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *FEBS Lett.*, 496: 86-90

Williams, S.B., Vakonakis, I., Golden, S.S., LiWang, A.C. (2002) Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15357-15362.

Xu, Y., Piston, D.W., Johnson, C.H. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock

proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 151-156.

Xu, Y., Mori, T., Johnson, C.H. (2000) Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *EMBO J.* 19: 3349-3357.

Xu, Y., Mori, T., Johnson, C.H. (2003) Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* 22: 2117-2126.

## 鳥類の時計遺伝子と光周性

安尾しのぶ、渡邊美和、海老原史樹文、吉村 崇

名古屋大学大学院生命農学研究科バイオモデリング講座

温帯地域の多くの鳥類では日長に応じて性腺軸の活性やプロラクチンの分泌量が変化する。日長計測には概日時計が利用されていることが知られているが、日長を測る時計の存在はいかなる種でも明らかではない。最近、我々はウズラの光周性制御部位として知られる視床下部内側基底部 (mediobasal hypothalamus, MBH) において、これまで鳥類でクローニングされている全ての時計遺伝子が発現していることを明らかにした。さらにその発現パターンはいかなる光条件でも変化しなかった。これらの結果から、MBHには光感受相を一定の位相に保持する光周時計が存在する可能性を指摘した。一方、プロラクチン分泌の光周性制御部位と思われる下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) でも時計遺伝子が発現していた。特に *Per2* と *Cry1* が強く発現しており、日長に応じてその位相関係が変化した。*Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の活性を変化させるため、日長はそれらの位相関係の変化を通じて分子レベルの変化に置き換えられることが考えられた。またこの機構はヒツジのPTで示唆されているものと同様であり、鳥類と哺乳類とで光周性制御機構が保存されている可能性が考えられた。

### はじめに

温帯に棲息する多くの鳥類は1年の中で変化する日長を読み取り、繁殖に適した季節に性腺の増大や換羽などの生理反応を示す。このような性質は光周性と呼ばれ、餌の豊富な時期と子育ての時期を一致させるために生物が獲得してきた生殖戦略の一つである。日長は概日時計を利用して計測されることが知られている。哺乳類は概日時計を通じて出力されたメラトニンの分泌亢進時間の長さで日長を判断するが<sup>1)</sup>、鳥類ではメラトニンは光周性に関与しない<sup>16)</sup>。また鳥類の概日時計振動体である眼や松果体や視交叉上核を除去しても光周性反応は正常に起こることから<sup>5, 15, 43)</sup>、日長を測る「光周時計」がこれらの部位以外に存在すると考えられてきた。しかし鳥類では概日時計を刻む因子が分かっていたため、「光周時計」の正確な位置や分子メカニズムは全く検討されていなかった。近年鳥類の時計遺伝子がクローニングされ<sup>2, 7, 10, 37, 47, 50)</sup>、日長計測機構を分子レベルで探る突破口が開かれた。この総説では我々がこれまでに行ってきた時計遺伝子の発現解析の結

果をもとに鳥類の光周性における時計遺伝子の役割について概説する。

### 1. 性腺軸の光周性制御部位

性腺軸に関する光周性制御は視床下部ホルモンの調節により行われている。即ち、視床下部の正中隆起 (median eminence, ME) に蓄積された性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) が光周時計の制御を受けて下垂体門脈に放出され、続いて下垂体から黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) が分泌されると生殖腺が増大する<sup>6)</sup>。

ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) は短日条件から長日条件に移すと初日からGnRHやLHの増加が見られ<sup>33)</sup>、短期間で劇的に精巣重量が変化することから古くより光周性の実験に用いられてきた。ウズラを用いた数多くの実験結果から、光周性制御部位は漏斗核 (infundibular nucleus, IN) やME、視床下部背側部 (dorsal hypothalamus, DH) を含む視

床下部内側基底部 (mediobasal hypothalamus, MBH) であることが知られている。例えばINやME、DHを局所的に破壊すると光周性反応が阻害されることが報告されている<sup>4, 35, 40</sup>。さらにMBHを電気刺激するとLHの上昇や生殖腺の発達を再現できること<sup>14, 36</sup>、c-Fosタンパクが光周性反応時に特異的にINやMEで発現することも示されている<sup>26, 27</sup>。また光ファイバーや発光ビーズを用いた局所的照射実験から、光周性に影響を及ぼす光はMBHで受容されることが示唆されている<sup>38, 39</sup>。さらにオプシン抗体の一つであるRET-P1に対する免疫陽性反応がINに検出されている<sup>42</sup>。これらのことから、MBHには光周性に関する光入力、光周性反応開始時の神経活動、内分泌系への出力といった光周性反応に重要なコンポーネントが含まれることが示唆されてきた。

MBHの光周性における重要性は哺乳類に関する報告からも伺える。哺乳類ではメラトニンが暗期の長

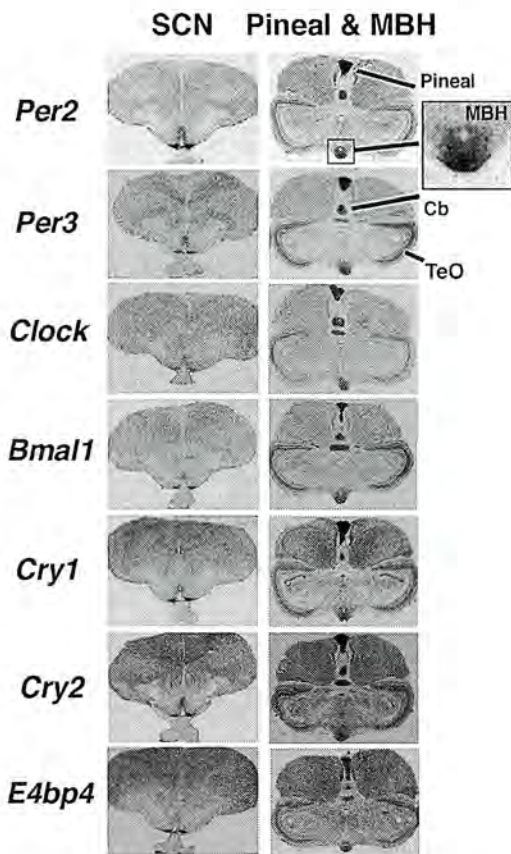


図1 ウズラの視交叉上核 (SCN)、松果体 (Pineal)、および視床下部内側基底部 (MBH) における時計遺伝子の発現<sup>48)</sup>  
*Per2*のMBHにおける発現の拡大図 (四角で囲った部分) を右に示した。検討した全ての時計遺伝子がSCN、松果体、MBHに発現していた。Cb: 小脳、TeO: 視蓋

さを伝達するが、MBHにはメラトニン受容体が存在することや<sup>46)</sup> ハムスターのMBHを破壊すれば光周性反応が阻害されることが示されている<sup>1, 25)</sup>。またヒツジの様々な脳部位にメラトニンを投与するとMBHに投与した時のみにLHの分泌量が変化する<sup>19, 22, 23)</sup>。これらの報告から、メラトニンの長さを読み取り性腺軸の活性を制御する機構がMBHに存在すると考えられてきた<sup>24)</sup>。

## 2. MBHの時計遺伝子発現

MBHが光周性の制御に重要であることが知られてきたにも関わらず、MBHに光周時計が存在するか否かはいかなる種でも全く分かっていなかった。近年鳥類において数々の時計遺伝子がクローニングされ、概日時計の分子機構が解明されてきた<sup>2, 7, 10, 37, 47, 50)</sup>。

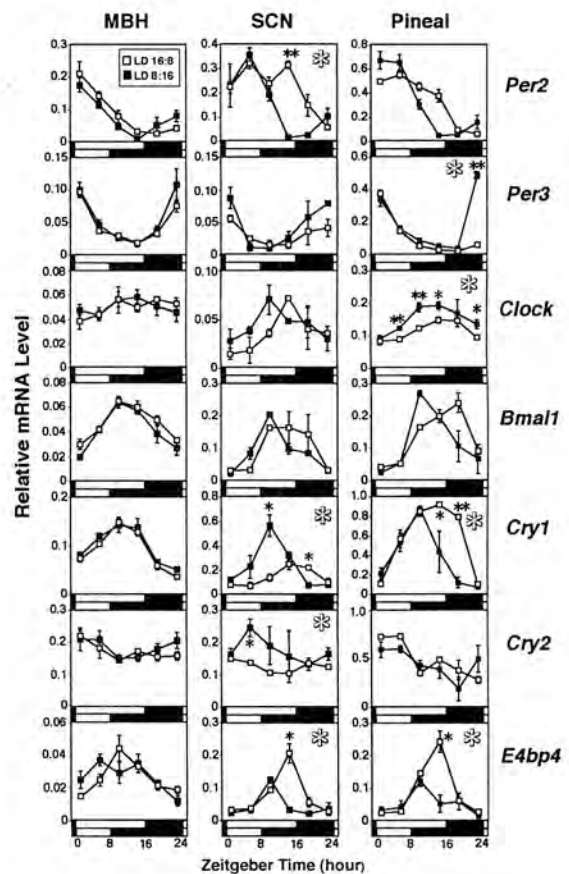


図2 長日条件と短日条件における、ウズラの視交叉上核 (SCN)、松果体 (Pineal)、および視床下部内側基底部 (MBH) における時計遺伝子の発現リズム<sup>48)</sup>  
 □が長日条件 (LD16:8)、■が短日条件 (LD8:16) を示す。各グラフの下は明暗条件を表す。長日条件群と短日条件群の差はグラフ右上の白いアスタリスクで (two-way ANOVA、\* $P < 0.05$ )、各サンプリングポイントにおける差は黒いアスタリスクで表した ( $t$ -検定、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。

我々はこれらを用いてウズラのMBHにおける光周時計の存在を検討した<sup>48)</sup>。その結果、鳥類でクローニングされている全ての時計遺伝子 (*Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *E4bp4*) がMBHに発現していることが明らかとなった (図1)。さらにその発現様式を長日条件、短日条件、恒暗条件、恒明条件、光中断条件 (短日条件の暗期の様々な位相に短い光照射を追加した光条件) において網羅的に調べた。その結果、位相や振幅に大きな変化は認められず常に安定したリズムが刻まれていることが判明した。(図2、長日条件と短日条件のみ示す)。

これらの結果から、MBHには日長に影響されない光周時計が存在することが示唆された。我々が示した時計遺伝子発現の局在は、光周性反応開始時にc-Fosタンパクが誘導される部位や局所破壊により光周性反応が阻害される部位と一致し、これらの時計遺伝子発現が光周性制御機構に関与していることが考えられた。

MBHにおける時計遺伝子の役割は明らかではないが、ウズラの日長計測機構には光感受相の概日リズムが関係していることから<sup>49)</sup>、MBHの時計遺伝子は光感受相を制御することが考えられる。我々が示したようにMBHの時計遺伝子の発現パターンは様々な光条件で変化しなかったが、これは光感受相の位相が一定に保持されていることを示唆する。最近我々は甲状腺ホルモンのサイロキシン ( $T_3$ ) を活性化型のトリヨードサイロニン ( $T_4$ ) に変換するtype2 iodothyronine deiodinase (*Dio2*) がMBHにおいて光感受相にのみ誘導され、 $T_3$ を脳室内投与すると光周性反応が再現できることを示した<sup>51)</sup>。したがってMBHの時計遺伝子は*Dio2*の発現誘導に時間依存性をもたらしていることが考えられるが、この点については今後の課題である。

### 3. プロラクチンの光周性制御機構

光周性反応はGnRH分泌の他、換羽や抱卵行動などを促すプロラクチンの分泌にも認められる<sup>3, 41)</sup>。プロラクチンの光周性制御機構は哺乳類で研究が進んでおり、高密度のメラトニン受容体が存在する下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) が重要であることが知られている<sup>31, 32, 167)</sup>。PTからは日長に応じて tuberallin と呼ばれるプロラクチン放出促進因子が分泌され、下垂体前葉からのプロラクチン分泌量が調節される仕組みである<sup>12, 141)</sup>。さらに近年、ハムスターやヒツジのPTにおいて時計遺伝子が周期的に発現し<sup>20, 28-30)</sup>、その発現パターンを変化させてメラトニ

ンの長さを読み取っていることが示唆されている<sup>17, 18)</sup>。

一方、鳥類のPTとプロラクチンの光周性制御機構との関係はほとんど検討されていない。鳥類では視床下部から放出される血管作動性腸管ポリペプチド (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) がプロラクチンの放出因子であるため<sup>8)</sup>、PTではなく視床下部が注目されてきたためである。しかしVIP神経が局在するMBHを破壊したウズラでも血中プロラクチン量は長日条件に正常に反応して上昇することから<sup>13)</sup>、プロラクチンの分泌制御が必ずしもVIPの完全な支配下にあるわけではなくPTが関与する可能性が考えられる。

### 4. PTの時計遺伝子発現

そこで我々はウズラのPTに注目し、時計遺伝子の発現を検討した<sup>18, 49)</sup>。MBHと同様、これまでにクローニングされている全ての時計遺伝子について検討したところ、*Per2*と*Cry1*が強く発現していることが明らかとなった。*Clock*や*Bmal1*などの発現も確認されたが、その発現は弱い傾向にあった。さらに様々な光条件で*Per2*と*Cry1*の発現パターンを検討した。驚いたことに、いかなる光条件でも一定のリズムが刻まれていたMBHと異なり、日長に応じて発現パターンの変化が見られた (図3)。最も顕著な

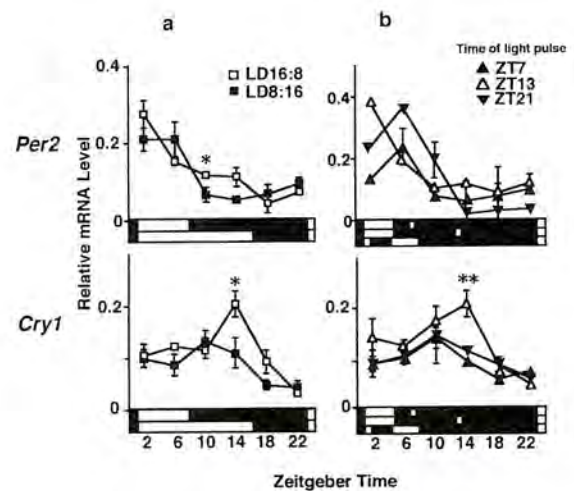


図3 ウズラの下垂体隆起葉における *Per2* と *Cry1* の発現リズム<sup>48, 49)</sup>

aは長日条件 (□, LD16:8) と短日条件 (■, LD8:16) を、bは光中断条件を表す。光中断条件では短日条件 (LD4:20) の暗期に30分の光パルスでZT7 (▲)、ZT13 (△)、ZT21 (▼) に10日間照射した。各グラフの下のバーは明暗条件を表す。各サンプリングポイントにおける差をアスタリスクで表した (one-way ANOVA, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )。

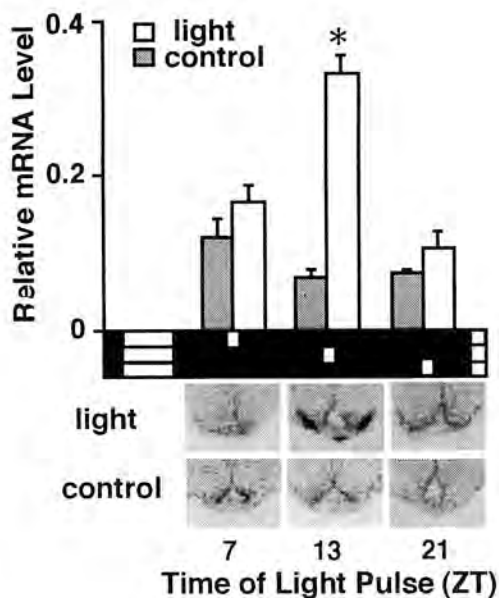


図4 ウズラの下垂体隆起葉における *Cry1* の光発現誘導<sup>49)</sup> 短日条件 (LD4:20) の ZT7、13、21 から 30 分の白色光を照射した。サンプリングは光照射終了から 90 分後に行った。グラフの下に各群のオートラジオグラムの代表例を示した。光感受相 (ZT13) 特異的に *Cry1* の発現が誘導された (Mann-Whitney *U*-検定、 $P < 0.01$ )。

変化は *Cry1* の発現ピーク時間に見られ、長日条件や光感受相を含んだ光中断条件ではピーク時間が後退した。この原因として *Cry1* の発現がそれらの光条件でのみ誘導されることが原因と考えられたため、次に暗期の様々な位相に光を照射して *Cry1* の発現誘導を検討した。すると光感受相でのみ *Cry1* の発現が誘導されることが明らかとなった (図4)。一方、*Per2* は日長が変化してもピーク時間は明期初期に保持されていた。

これらの結果からウズラの PT における日時計機構のモデルを考えた (図5)。短日条件などの光感受相を含まない光条件では *Cry1* の発現は誘導されず、比較的弱いピークが明期と暗期の中間に存在する。しかし長日条件など光感受相に光が照射されれば *Cry1* の発現が誘導され、ピークが後退する。その結果、短日条件と長日条件で *Per2* と *Cry1* の位相関係が変化する。*Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の転写を制御するため<sup>21, 41)</sup>、これらの位相関係の変化を通じて日長が分子の変化に置き換えられることが考えられる。そして諸々のシグナルリレーを経てプロラクチンの分泌調節につながると考えられる。実際に、ウズラの血中プロラクチン量の変動はこのモデルに合致することを我々は確かめている<sup>49)</sup>。

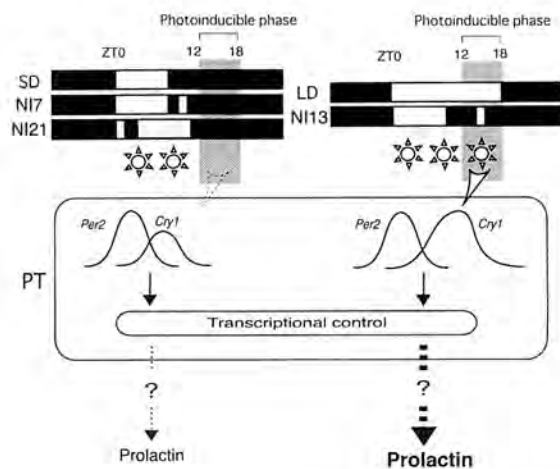


図5 ウズラの下垂体隆起葉 (PT) におけるプロラクチン分泌の光周性制御機構<sup>49)</sup>

*Per2* の発現リズムのピークはいかなる光条件でも明期開始付近に固定されている。一方 *Cry1* の発現は光感受相 (Photoinducible phase, ウズラの場合は ZT12-18) で特異的に誘導され、長日条件では発現のピークが後退する (図の右側)。その結果 *Per2* と *Cry1* の発現リズムの位相関係が変化する。その結果 *Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の転写を調節するため、位相関係の変化がプロラクチン分泌量の変化につながる。SD: 短日条件、LD: 長日条件、NI: 光中断条件

## 5. 鳥類と哺乳類における光周性制御機構の類似性

近年、ヒツジの PT で *Per* と *Cry* の発現リズムが長日条件と短日条件で変化することが報告され、PT における時計遺伝子がメラトニンの長さを分子レベルの変化に置き換える役割を担うことが示唆されている<sup>17, 18)</sup>。我々が示したウズラの PT における時計遺伝子の動態はヒツジにおけるこれらの報告と類似している。すなわち、日長を PT へ入力する媒体が違うが (ヒツジではメラトニン、ウズラでは光)、分子レベルでは同様の変化が起こっていると言える。したがって哺乳類と鳥類の間で光周性制御機構の基本的な部分は保存されていることが示唆された。

我々は最近 MBH における性腺軸の光周性制御についても哺乳類と鳥類で保存されている可能性を示した。ウズラの MBH では長日条件で *Dio2* の発現量が増加して性腺軸を活性化することが考えられているが、同様のことがハムスターでも観察されたのである<sup>45)</sup>。すなわち長日条件で *Dio2* の発現が増加し、さらに短日条件を模したメラトニン投与実験で発現が抑制された。これらのことは PT と同様、哺乳類と鳥類とでメラトニンや光などの入力経路の違いはあるが本質的なメカニズムは保存されていることを示唆している。



## おわりに

数年前から時計遺伝子は一日の時を刻む因子として同定されてきた。その同じ分子が日長を測ることに利用されているということは、生物が厳しい自然条件に際して同一の分子に様々な調節機構を形成しながら適応してきたことが伺えて大変興味深い。MBHやPTにおける時計遺伝子が実際にいかなる因子の転写調節に関わるのかはまだ明らかではないが、今後は時計遺伝子と相互作用する因子の同定や光の入力経路等を明らかにすることが必要である。

## 参考文献

- 1) Bae HH, Mangels RA, Cho BS, Dark J, Yellon SM, Zucker I: *J Biol Rhythms*. 14:391-401 (1999)
- 2) Chong NW, Bernard M, Klein DC: *J Biol Chem*. 275:32991-32998 (2000)
- 3) Curlewis JD: *Reprod Fertil Dev*. 4:1-23 (1992)
- 4) Davies DT, Follett BK: *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 191:285-301 (1975)
- 5) Davies DT, Follett BK: *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 191:303-315 (1975)
- 6) Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF: *J Biol Rhythms*. 16:365-380 (2001)
- 7) Doi M, Nakajima Y, Okano T, Fukada Y: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8089-8094 (2001)
- 8) El Halawani ME, Youngren OM, Pitts GR: *Perspectives in avian endocrinology*, pp 403-416. Bristol, *J Endocrinol Ltd*. (1997)
- 9) Follett BK: *J Reprod Fertil Suppl*. 19:5-18 (1973)
- 10) Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H: *J Biol Rhythms*. 17:14-27 (2002)
- 11) Goldman BD: *J Biol Rhythms*. 16:283-301 (2001)
- 12) Hazlerigg DG, Hastings MH, Morgan PJ: *J Neuroendocrinol*. 8:489-492 (1996)
- 13) Juss TS: *Avian endocrinology*, pp 47-60, Bristol, *Soc Endocrinology*. (1993)
- 14) Konishi H, Foster RG, Follett BK: *J Comp Physiol [A]*. 161:315-319 (1987)
- 15) Konishi H, Iida K, Ohta M, Takahashi M: *Gen Comp Endocrinol*. 72:461-466 (1988)
- 16) Kumar V, Juss TS, Follett BK: *Melatonin and the pineal gland from basic sciences to clinical applications*, pp 163-168, Amsterdam, Elsevier Publ. (1993)
- 17) Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg DG: *J Neuroendocrinol*. 15:390-397 (2003)
- 18) Lincoln GA, Andersson H, Loudon A: *J Endocrinol*. 179:1-13 (2003)
- 19) Lincoln GA, Maeda KI: *J Endocrinol*. 132:201-215 (1992)
- 20) Lincoln GA, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg DG: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13890-13895 (2002)
- 21) Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS: *Science*. 288:483-492 (2000)
- 22) Malpoux B, Daveau A, Maurice F, Gayraud V, Thiéry JC: *Biol Reprod*. 48:752-760 (1993)
- 23) Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P: *Endocrinology*. 139:1508-1516 (1998)
- 24) Malpoux B, Vigié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P: *Brain Res Bull*. 44:431-438 (1997)
- 25) Maywood ES, Hastings MH: *Endocrinology*. 136:144-153 (1995)
- 26) Meddle SL, Follett BK: *J Comp Physiol [A]*. 176:79-89 (1995)
- 27) Meddle SL, Follett BK: *J Neurosci*. 17:8909-8918 (1997)
- 28) Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG: *Neuroreport*. 12:579-582 (2001)
- 29) Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG, Morgan PJ: *Eur J Neurosci*. 12:2865-2870 (2000)
- 30) Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9938-9943 (1999)
- 31) Morgan PJ: *J Neuroendocrinol*. 12:287-295 (2000)
- 32) Morgan PJ, Williams LM: *Rev Reprod*. 1:153-161 (1996)
- 33) Nicholls TJ, Follett BK, Robinson JE: *J Endocrinol*. 97:121-126 (1983)
- 34) Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A: *Physiol Rev*. 68:133-176 (1988)
- 35) Ohta M, Homma K: *Gen Comp Endocrinol*. 68:286-292 (1987)
- 36) Ohta M, Wada M, Homma K: *J Comp Physiol*

- [A]. 154:583-589 (1984)
- 37) Okano T, Yamamoto K, Okano K, Hirota T, Kasahara T, Sasaki M, Takanaka Y, Fukada Y: *Genes Cells*. 6:825-836 (2001)
  - 38) Oliver J, Baylé JD: *Experientia*. 38:1021-1029 (1982)
  - 39) Saldanha CJ, Leak RK, Silver R: *Psychoneuroendocrinology*. 19:641-656 (1994)
  - 40) Sharp PJ, Follett BK: *Neuroendocrinology*. 5:205-218 (1969)
  - 41) Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM: *Neuron*. 19:1261-1269 (1997)
  - 42) Silver R, Witkovsky P, Horvath P, Alones V, Barnstable CJ, Lehman MN: *Cell Tissue Res*. 253:189-198 (1988)
  - 43) Siopes TD, Wilson WO: *Poult Sci*. 53:2035-2041 (1974)
  - 44) Stirling JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS: *J Neuroendocrinol*. 13:147-157 (2001)
  - 45) Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 145:1546-1549 (2004)
  - 46) Williams LM, Morgan PJ, Hastings MH, Lawson W, Davidson G, Howell HE: *J Neuroendocrinol*. 1:315-320 (1989)
  - 47) Yamamoto K, Okano T, Fukada Y: *Neurosci Lett*. 313:13-16 (2001)
  - 48) Yasuo S, Watanabe M, Okabayashi N, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 144:3742-3748 (2003)
  - 49) Yasuo S, Watanabe M, Tsukada A, Takagi T, Iigo M, Shimada K, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 145:1612-1616
  - 50) Yoshimura T, Suzuki Y, Makino E, Suzuki T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Namikawa T, Ebihara S: *Brain Res Mol Brain Res*. 78:207-215 (2000)
  - 51) Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S: *Nature*. 426:178-181 (2003)

## アメリカでのポストドク生活—テネシー州ナッシュビルより

太田 英伸

自分が生物時計の世界に入ったきっかけは、音に対する新生児の驚愕反射の慣れのレベルが睡眠サイクルで異なることを、発達心理学の分野で勉強したことから始まりました。当時は、北大乳幼児発達臨床センターの陳省仁先生の指導の下、新生児室の先生方、助産婦さんに助けられ、今にも壊れそうな赤ちゃんの身体的なかよわさに、おっかなびっくりしながら、実験をしていました。その後小児科医になり、未熟児・新生児医療にたずさわること、ましてや、こうして生物時計の発達をテーマにアメリカでポストドク生活することなど全く頭にありませんでした。最終的に大学院で生物時計を勉強したいと思ったのは、横浜の小児病院の図書室で、Nature (1997)に掲載された程先生・岡村先生のPer1の論文を眺めたときでした。それまでも、新生児室のモニターに記録されている心拍数・呼吸数・血中酸素飽和度等のリズム解析を自分でしていましたが、それが単なるマスキングなのか、意味のある内因性リズムなのか、よく分かりませんでした。動物実験で新生仔マウス・ラットSCNのPer1を測定できれば、答えが分かるだろうとぼんやりと考えました。当時はPediatricsといった小児科学専門誌にも、自分と同じように未熟児・新生児の心拍数といった生理指標のリズムを測定した論文が時々目に留まるようになっていました。生物時計の発達を研究することが未熟児・新生児医療の改善につながるのではないかと、保育器の環境を考える手がかりになるのではないかと、という期待感もあり、その後、北大第一生理学講座で大学院生となりました。

アメリカ留学後まだ自分の仕事がまとまらない状況で、自分や所属研究室の仕事について、みなさんに紹介するのは気が引けたので、今回は留学にあたって考えたこと（どうして留学する気になったのか）、そして留学の前と後で何が期待通りで、何が思惑と違ったのかについて、まとめてみたいと思います。その中で、バンダービルト大学の4つの時間生物学の研究室

について軽く触れることができれば、と思います。

自分が留学を考えた動機には、幾つかあります。

1. 時計の発達について自分のアイデアを実現するには、Per1-GFP/Lucマウスを使用できる環境にいた方が、都合がいいのではないかと考えたこと。
2. 光同調の発達が重要だと感じたこと。日本で行った研究では、時計の母子同調を考える手段として盲目ラット新生仔を使っていました。しかし、眼球を摘出しない通常のラット新生仔においては生後1週目から光同調が時計に強く影響すること、また、視覚系の発達スピードがげっ歯類より速いヒトの赤ちゃんに対して時計の知識を応用することを考えると、光同調に関する知識を深めなければいけないと感じていました。現在のポスのマックマン先生は、生物時計だけでなく視覚研究にも学問的に強いバックグラウンドをもっています。就職先を探すために渡米した際、何人かの教授と面接を行いました。明らかにその点が他の方と異なっていたので魅力を感じました。
3. 新しい研究室の雰囲気求めたこと。医学部という世界で仕事・研究を行い、人間関係・仕事の取り組みに対する医学部独特の閉塞性を感じていました。全く問題のない研究環境は存在しないとは思いますが、限度というものがあるだろうと、諸先輩方に降りかかった火の粉を横目で見つつ、今までの環境を離れ、新しい理学部（正確には生物学部）という世界で、医学を考えてみようよと、思い立ちました。できたら、政治にあまり興味のない若干若手の教授が主催する研究室に所属したいとも考えていました。
4. アメリカの研究の雰囲気に憧れたこと。以前アメリカで開かれた国際学会に出席した際、

すでに留学している日本人の研究者の方たちに、アメリカでは研究者にオリジナリティーを求める雰囲気が日本より強くあるのではないかと、と言われたのが心に残りました。

5. 自分の研究室をもつことを意識したこと。将来、幸運にも自分が研究室をもつ機会に恵まれた場合、その準備として研究室立ち上げのプロセスを勉強したいと考えていました。たまたま自分の留学開始時期は、現在所属する研究室がケンタッキー大学からバンダービルト大学に移ってきて半年の時期であり、また隣の研究室の山崎先生が実際に立ち上げを行っている時期でした。日本でも国公立大学の独立法人化のプロセスが進む中で、その研究室の運営が、ポストドクを基礎としたアメリカの運営形態に似た部分をもって移行して行くのではないかと感じていました。
6. 外国を職場に選ぶチャンスがこれで最後かもしれないと思ったこと。自分は30代半ばになったので、様々な仕事・家庭環境から外国生活のチャンスは今を逃すと難しいように思いました。また、研究者として生きていくなら、留学を機会に英語のプレゼンテーション能力を高めておきたいと考えました。

その後、1年経って感じたことは、

1. トランスジェニック・マウス：マックマーン先生の中で発達に関するテーマが興味があるためか、また、研究室の立ち上げという時期と重なったためか、トランスジェニック・マウスに基づいた自分のアイデアは意外とスムーズに受け入れられているように思います。しかし、以前Per1-GFPマウスを扱っていた主な大学院生が卒業していなくなっていたこと、また、自分に顕微鏡に関する知識が欠けていたという2つの理由から最初の数ヶ月はシステムの調整に苦労しました。その時期に、顕微鏡の専門家のマックマーン先生や同僚から顕微鏡のイロハを教わったこと、また、Per1-lucシステムを開発した山崎先生に培養方法について指導を受けたことは非常に幸運でした。もし、これらの環境が揃っていなければ、ハードウェアが問題なのか、培養条件が問題なのか、問題の焦点を絞れず、どうどう巡りを長い間繰り返すことになったように

思います。また、隣のジョンソン研究室には、マウス・ヒトPer1をクローニングした程先生の研究室から来た肥田（福田）さんがポストドクをしており、Per1プロモーターについて直接教えてもらえたことも非常に幸運でした。

2. 生物時計の発達と視覚研究：ここバンダービルト大学は視覚研究が非常に盛んな大学です。そのため、マックマーン先生に加え、視覚研究の優秀な研究者が多数研究を行っており、私も他の視覚研究者と共同研究を行っています。自分の小児科・生物時計の知識と視覚研究者の知識がうまく融合し、自分の学問的興味を満たしつつ、小児科医療に貢献できることを祈って研究を進めています。
3. 新しい研究の雰囲気：場所も言葉も違い、また、4つの生物時計研究室が混在して、今まで経験したことのない研究の雰囲気に包まれています。
  - 1) ジャーナル・クラブ：1週間に1度、4研究室の合同で最近の論文を検討するジャーナル・クラブがあります。それは、ジョンソン先生、マックマーン先生、ページ先生、山崎先生4人が論文検討に参加するということを意味しており、先生方によってデータの見方が異なることがよく分かります。特にジョンソン先生とページ先生はバンダービルト大学での付き合いも長く、お互いの気心が知れているせいか、意見が異なる場合もかなり突っ込んだ意見の交換を行うことが多いようです。
  - 2) 雑談：他学部出身の研究者、あるいは異なる生物を扱う研究者（マックマーン先生はげっ歯類・魚類、ページ先生は主に昆虫、ジョンソン先生と山崎先生は不特定）と雑談することによって、自分の頭の中で解決できなかった問題にヒントをもらうことが多々あります。別の言葉で言えば、それは自分の頭が固かったなあと思う瞬間でもあります。その意味で、自分が無意識にベースとしている世界を離れる発想を身につけようと、チャンスがあれば諸先生方と科学雑談しようと心がけて（？）います。ページ先生とは、

夕方コーヒーを飲む時間に休憩所でいっしょになる機会も多く、自分は全く扱ったことのないゴキブリを題材に夜行性動物と昼行性動物の生物時計における進化について2人で考えてみたことがあります。自分の研究に直接結びつくかどうかはよく分かりませんが、興味深い考え方を聞く機会に恵まれています。

4. アメリカではオリジナリティーを求められるか? : マックマーン先生が、オリジナリティーを私の研究に対して強く求めているかどうかは正直言ってよく分かりません。ただ、研究助成金(グラント)申請時のテーマについては、意味のある新しいテーマを申請しなければ、グラントをもらうことが難しいという厳しい現実があるようです。このアメリカのグラント決定システム自体が、自然と研究者に新しい意味のあるテーマを模索させるという雰囲気をつくっているのかもしれませんが。日本の研究助成金の決定には人脈が大きくかわると言われていいいますが、アメリカではむしろグラント申請書内容にもとづいた割合公平な審査が行われているようです。マックマーン先生も、昨年グラント書類を宅急便の箱に収めたときは、敬虔なクリスチャンではないと思いますが、お祈りを冗談でしていました(自分も日本流に手をたたきました)。その後は、大学受験の合格通知を待つ受験生のようにNIHからの決定を神妙に待ち、先日うれしい知らせが電話で伝えられました。

5. アメリカの研究室という職場で学ぶこと:
- 1) 研究室の立ち上げ: マックマーン研究室がバンダービルト大学に移ってきてから半年後に自分が来たということもあって、一から全て準備していくという作業に携わることはありませんでした。マウス管理の大部分は終了しており、自分にはサーカディアン・リズムの研究に欠かせない行動計測に関するソフト・ハードを整備する仕事(山崎先生の助手として)、また、今後の研究展開に必要な動物プロトコルの作成等の仕事が研究室の立ち上げ仕事として割り当てられました。動物プロトコルの作成は、動物愛護の考え

方とあいまって厄介でかつ重要な仕事でした。完全に独立した審査委員会で実験プロトコルが了承されないかぎり、アメリカでは実験がスタートできない状況です。このプロトコル作成の作業に早めに慣れる事ができたのは、今後の研究計画作成の勘をつかむ上で重要だったように思います。

- 2) グラント獲得のための準備: 今年はたまたま1つのグラントの更新時期だったため、アメリカでの生活が落ち着いたと安心していたところ、グラントのためのデータ作成という忙しい時期に突入しました。ポストドク一人一人に、作成すべきデータとおよその期限が割り当てられ、研究者も結果が全ての職人だなと思いつつ仕事をこなして行きました。同時にグラントの原稿を渡され意見を求められるので、表面的にもグラント作成のプロセスを眺めることができ、有意義でした。

#### 6. 難しいなあと感じた点

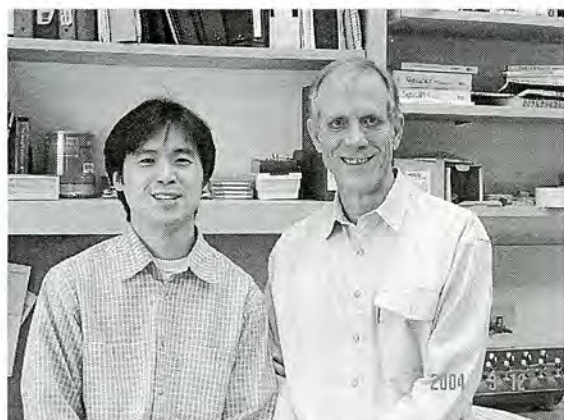
- 1) 2つの分野(時間生物・視覚研究)が1つの研究室に混在するという点: 2つの異なる研究分野の人間が、基礎知識の溝を埋めるにはお互いの努力が必要だと感じました。どちらの努力が欠けても落とし穴がある実験プロトコルができてしまいます。自分には視覚研究の知識が足りなかったため、分からないことはなるべく視覚研究が専門の同僚に質問するようにして、一度マックマーン先生に薦められた教科書を勉強しました。このような溝埋めはポストドク個人の努力によることが多いようで、勉強家の人と不勉強な人の差が大きいように思います。
- 2) 新入社員教育: となりのジョンソン研究室は大所帯で、かつ時間生物をバックグラウンドにもっていないポストドクもいるという理由から、ジョンソン先生自ら、日本企業の新人研修しながら基礎知識を叩き込む講義を行っていました。面白そうなので、自分も参加させてもらったところ、一皮むけた講義を聴く機会に恵まれました。光条件に合わせた位相反応曲線の変化をプロットさせる宿題が出るな

ど、かなり緻密な講義で自分も真似したいと講義の勧め方をノートさせていただきました。お互い同じバックグラウンドを共有することの難しさをここでも感じました。

- 3) 日本の社会と同じように、誠実な同僚もいれば、そうでない同僚もいるようです。その中でお互いがスムーズに実験機材を共有し実験を進めていく上で大事なのは、実験時間が他人衝突しないように自分ですらしてしまうこと（自分は夜も昼もない職場で昔働いていたのであまり苦痛ではありません）と、ボスの公平な態度のように感じています。留学先を決定する際も、ボスの公平さが非常に気にかかっていたのですが、自分の直感はそれなりに正しかったようで、無事毎日を過ごしています。
- 4) 大学院生がこれから加わって：現在はポストクのみ職場ですが、将来は大学院生が研究室に入ってきます。ただ、大学

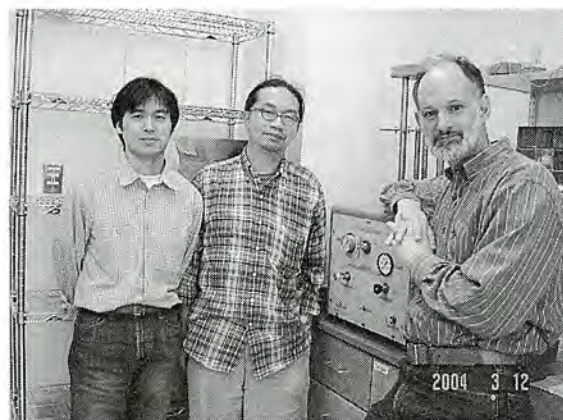
院生がいない職場というのは、それほどアメリカでは不思議な状況ではないようです。むしろポストクの中には、大学院生が来ると競争が増えるから入らないほうが良いと考えている人もいます。基本的には学位がかかっている大学院生がポストクより優先されることが多いという状況が、そういった考え方の背後にあります。日本の職場で育つと、上になれば下の人より自由な時間が制限されるのは仕方がないこと、と思う傾向があると思いますが、アメリカの職場はドライな見方をするようです。そういう目で新参者の私も見られているのかもと、少し寂しい気持ちになることもあります。

総じて言えば、公平な上司の下、興味のある発達のテーマを続けられている幸せなケースのように思います。後は自分次第ということだと思います。



筆者

ページ先生



山崎先生

ジョンソン先生



マックマーン研究室（中心がマックマーン先生）

## 第2回 Molecular Clock 東京 2004 に参加して

渡辺 剛史

名古屋大学大学院生命農学研究科

2月26日から28日にわたり東京都板橋区の東京カンファレンスセンターで開催された国際シンポジウム“Molecular Clock 東京2004”に参加しました。

このシンポジウムは、神戸大学の岡村均先生の主催で行われ、今回は二回目の開催でした。2001年に淡路島で行われた第1回大会は、アメリカでの同時多発テロの直後ということもあり、多数の外国人研究者の講演がキャンセルとなる非常事態でしたが、今回はイラク戦争から約一年がたち警戒体制が強まっていたものの、大きな事件もなくプログラムどおり講演を聞くことができました。

2003年度は昨年9月に北海道大学で行われた第1回時間生物学世界大会にも参加することができ、日本に居ながらにして半年の間に二度も世界をリードする時間生物学者を目の当たりにできたことは、学生の私にとってとても幸運でした。

大会前には、筆者の研究室ではMorehouse大学の福原千秋先生を客員研究員に迎え、様々なディスカッションをしていただきました。福原先生は最近、Gianluca Tosini博士と共に、網膜でのメラトニン合成がtype 1 adenylyl cyclaseを介して概日時計により制御されているという報告をしていて、大会ではポスターでその発表をされていました。2週間ほど研究室に滞在なさいましたが、筆者の研究に対しても姉御のようにいろいろな指摘をしていただき、刺激になりました。ちなみに福原先生とは、大会後に研究室の同僚と観光で訪れた六本木ヒルズでばったりと会ってしまいました。その日は、土曜日ということもあり人であふれかえる中で偶然にも出会うなんて不思議な縁を感じました。

さて、Molecular Clock 東京2004では、3日間を通して2つの招待講演、9つのシンポジウムが行われました。招待講演では日本におけるゲノムプロジェクトをリードしてこられた東京大学の榊佳之先生と、長年にわたり睡眠覚醒の研究に御尽力されてこられた大坂バイオサイエンス研究所の早石修先生のレク

チャーを拝聴することができました。早石先生はプロスタグランジンの一つであるプロスタグランジン(PG) D2と睡眠覚醒リズムの関連について、精力的に行われてきた研究成果を発表なさいました。まずPGD2の投与がREM睡眠を増加させること、PGD2の合成酵素(PGDS)阻害剤やPGDレセプター(DPR)のアンタゴニストの投与が睡眠を妨げることからPGD2が睡眠の安定に関係していることを示された後に、PGDS及びDPRノックアウトマウスの断眠後の特徴的な表現型からPGDシステムがNREM睡眠の調節に重要な役割を果たすことを報告されました。学会の要旨集をみると、早石先生はなんと1920年生まれだそうで、80歳をこえられた現在でも研究に打ち込むことができるエネルギーに感銘を受けました。私が同じ年になった時も同様にパワフルでいられるよう、心身共に鍛えなくてはと思いました。

今回のシンポジウムでは、早石先生の睡眠覚醒に関する講演をはじめとして概日時計のフィードバックループそのものというより、概日時計の中核から影響を受ける様々な成分についての話題が多かったという印象を受けました。その中から、筆者の研究背景から個人的に興味を持った発表について抜粋して紹介します。

岡村均先生は、哺乳類の概日時計の中核である視交叉上核とその影響を受ける様々な末梢組織との間を、コルチコステロンが仲介する可能性を示唆されました。その中で岡村先生は、光の刺激がadrenal nerveの活動を活発にすることや光刺激によってコルチコステロンが急激に上昇すること、さらにadrenal nerveの切断によりその上昇が抑制されることを示されました。また、岡村先生は光刺激を与えた時のadrenal glandにおける遺伝子の発現パターンを網羅的に解析することで、コルチコステロンを含めた視交叉上核からの情報のdown stream pathwayを明らかにしようとしているようでした。

岡村先生の発表に関連する所では、Francis Lévi博士がマウスの休息期を妨害することで、コルチコステロンの分泌パターンが変化し、がん腫瘍の生成が促進されるという発表を行いました。Lévi博士は加えて、TGF- $\alpha$ などいくつかの遺伝子を腫瘍に関連する因子として挙げていました。

これまでホルモンの分泌パターンにリズム性があることや、ホルモンが生理的な恒常性に重要な役割を果たすことは周知の事実でしたが、このように視交叉上核と末梢組織をつなぐキーワードと、概日時計と病気（生活習慣病）をつなぐキーワードが一致していることを非常に興味深く感じました。

筆者の研究室では、行動リズムの活動相がスプリットするCSマウスや、フィリピンのマーケットで捕獲し恒暗条件下で行動リズムが消失してしまう突然変異マウスを保有していますが、いずれも視交叉上核での時計遺伝子の発現は正常である可能性が示唆されています。このことから、筆者の研究室で保有する突然変異マウスが視交叉上核に支配されるoutput geneに異常を持っていて、その原因遺伝子の解明が視交叉上核からの出力経路の解明に貢献できるのではないかと期待しています。筆者のこのような興味から、岡村先生やLévi博士の発表は私たちが今後、研究を進めていく上での参考として大変勉強になりました。

シンポジウム以外については、大会2日目に行われたバンケットに個人的な理由により参加できな

ったことが残念でした。今回のような日本で行われる大会は、SRBRのような規模の大きな学会では相手にしてもらえないような大物研究者と話を絶好の機会という話を聞きます。今回のシンポジウムにもPaolo Sassone-Corsi博士やWilliam Schwartz博士のような世界的に著明な研究者が参加されました。学生として、少ないチャンスを逃してはならないと実感しています。

最後に第二回を迎えたMolecular Clockシンポジウムに次回の開催予定がないということをとっても残念に思います。今回の大会は、国際シンポジウムであるにもかかわらず参加費も無料であり、学生の筆者にとって参加しやすい貴重な大会でした。今後も再び日本人の時間生物学者が大型の研究費を獲得されて、学生をはじめ若手研究者に世界の先端をいく研究者と接する機会を与えて下さることを期待します。



研究室のバーベキューでヤギの肉を食べる筆者（左）



Molecular Clock記念撮影より



## 日本時間生物学会学術奨励賞公募のお知らせ

昨年より日本時間生物学会の新企画として学術奨励賞を募集しております。この制度は時間生物学領域で顕著な業績をあげ、今後の活躍が期待される若手研究者を表彰するためのもので、年齢37歳までの方を対象としております。自薦他薦を問いませんので、第2回学術奨励賞へどしどしご応募ください。応募にあたっては、下記の様式にご記入いただきますようお願いいたします。

■ 締め切り：平成16年8月17日（火）必着

■ あて先：〒464-8602 名古屋市不老町 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻内  
日本時間生物学会事務局 近藤 孝男

日本時間生物学会学術奨励賞選考委員長  
石田 直理雄（産業技術総合研究所）  
選考委員  
海老澤 尚（埼玉医科大学）  
海老原 史樹文（名古屋大学）  
大川 匡子（滋賀医科大学）  
深田 吉孝（東京大学）

### 時間生物学術奨励賞候補者調書

1. 氏名：  
ふりがな
2. 生年月日：（平成 年 月 日現在）
3. 現職：
4. 最終学歴ならびに職歴：
5. 学会等での表彰歴：
6. 本件に関する連絡担当者名：
7. 業績
  - 1) 研究の名称：
  - 2) 研究の内容：  
・  
・  
・
  - 3) 時間生物学に対するこれまでの貢献と今後の可能性（具体的・分かり易く記述すること）：
  - 4) 論文リスト（ピアレビューのある原著論文のみ）

---

## 11回大会のおしらせ

---

第11回日本時間生物学会学術大会が、以下の通り行われます。  
みなさんの参加をお待ちしております。

### 第11回日本時間生物学会学術大会

■ 会 期：平成16年11月11日(木)、12日(金)

■ 会 場：ピアザ淡海(おうみ)  
(滋賀県大津市)

■ 大会会長：大川匡子(滋賀医科大学 精神医学講座)

特 別 講 演 1

教 育 講 演 1

シンポジウム 2

ワークショップ 2

程度を予定しています

■ 演題申し込み：大会ホームページURLよりのon line申し込みとなります。  
8月27日締め切り予定です。

## 賛助会員リスト (50音順)

以下の団体（代表者、敬称略）からは2004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）
理科研（株）	（森川義雄）
塩野義製薬株式会社	（竹村俊彦）

時間生物学会事務局

## 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下さい。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4~5ページ程度（1頁は約2100字と考えて下さい；横1行23文字で1頁 $46 \times 2 = 92$ 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（\_\_\_\_\_）、太文字（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<sup>1-3)</sup>、・・・である。<sup>5, 8, 9)</sup>。
- 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) 著作名：誌名、巻数、ページ（発行年）  
[書籍]通し番号) 著作名：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、本文とは別の用紙に作成する。
- 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。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枚は添付する。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。

時間生物学 Vol. 10, No. 1 (2004)

平成16年5月発行

発行：日本時間生物学会 (<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsc/index.html>)

(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

(印刷所) 名古屋大学消費生活協同組合 印刷・情報サービス部