

目次

巻頭言	本間 研一	1
第4回学術奨励賞受賞者論文		
哺乳類概日時計振動体—細胞株を用いた動作原理の追求—	八木田 和弘	2
総説		
抗癌薬の時間治療	大戸 茂弘	6
キイロショウジョウバエ概日時計の温度サイクル同調機構	吉井 大志・富岡 憲治	13
分節振動体がノイズの影響を緩和する機構	石松 愛・武田 洋幸・堀川 一樹	20
寿命という生物時間	高木 由臣	27
技術ノート		
概日リズム研究におけるルシフェラーゼとその応用	中島 芳浩・野口 貴子・池田 正明・近江谷 克裕	37
第13回大会関連記事		
第13回日本時間生物学会学術大会と第22回国際生物学賞記念シンポジウムを終えて	深田 吉孝・広田 毅	48
「第13回日本時間生物学会学術大会」と「第22回国際生物学賞記念シンポジウム」参加記	浜坂 康貴	50
シンポジウムS1 フィールド医学と時間医学	大塚 邦明	54
シンポジウムS2 「精神疾患とリズム」総括	海老澤 尚	54
ワークショップW2 「分子時計研究の最前線」総括記事	広田 毅	56
ワークショップW3 「メタボリックシンドロームとリズム」総括	前村 浩二	57
第5回日本時間生物学会学術奨励賞公募のお知らせ		60
第14回日本時間生物学会学術大会のお知らせ		61
第2回国際時間生物学会	本間 研一	62
事務局報告		63
執筆者のプロフィール		68
日本時間生物学会会則		71
賛助会員リスト		74
執筆要領		75
編集後記		

巻 頭 言



本間研一
理事長

ほ乳類の時計遺伝子発見を契機に、世界の研究室を席卷した時間生物学の分子生物学研究が一段落を迎え、世界の研究者たちは新しい地平に向けて満を持しているような今日この頃ですが、会員の皆さんはいかがお過ごしですか。昨年来、日本の時間生物学にとって、喜ばしい事が続けてありました。その1つは、日本の3大国際賞の1つである国際生物学賞の2006年度受賞テーマに時間生物学が採択され、日本人研究者とも馴染みが深いオランダのSerge Daan博士が受賞されたことです。これは、時間生物学が生物学の重要な分野であることが日本でも正式に認められ、権威づけられたことを意味します。Daan博士は、時間生物学の泰斗であるColin PittendrighやJürgen Aschoffのもとでポストドク時代を過ごし、今ではこの分野の古典となった5編の論文(J Comp Physiol, 1976)を著すとともに、その後も彼らの共同研究者として、時間生物学における大きな2つの潮流を融合させた功績が認められて、今回の受賞に至りました。ちなみに国際生物学賞は生物学者であった昭和天皇の在位60年を記念して制定された格式の高い賞です。朗報の第2は、名古屋大学理学研究科の近藤孝男先生が平成18年度朝日賞を受賞されたことです。朝日賞は朝日新聞が主宰する権威ある賞で、これまで野依良治氏、平山郁夫氏、ドナルド・キーン氏など日本の科学や文化を築いた人々に贈られています。近藤先生は、長年植物や藍藻類の生物時計について研究されてきましたが、特に藍藻類の分子生物学的な研究で、生物発光を利用したリズム解析法を時間生物学に初めて導入し、分子振動という新しい独創的な概念を提唱したことが評価されました。近藤先生の受賞は、日本時間生物学会にとりまして大きな喜びであります。

時間生物学会の最も重要な活動である学術大会は、今年11月、高橋敏治先生(法政大学)を大会長として、日本睡眠学会(大井田隆大会長)との合同大会として東京で開催されます。日本睡眠学会との合同大会は初めての試みですが、日本時間生物学会が「生物リズム研究会」と睡眠リズム研究が主体であった「臨床時間生物学研究会」とが合流して創設された経緯を考えると、むしろ自然な成り行きと思えます。昨今、学術研究の社会や国民への成果還元が強く求められているなか、日本時間生物学会も、基礎研究の一層の充実とともに、医学などの応用科学との連携を推進して行かなければならないと感じています。その観点からも、日本睡眠学会との合同大会は意義深いと思われれます。なお、この合同大会に先立ち、第2回国際時間生物学会(WCC)が開催されることがつい最近決まりました。4年前の2003年、日本時間生物学会がホスト学会となり、札幌市で第1回国際時間生物学会が開催されたことは記憶に新しいところです。第2回大会は米国でSRBRが主催することになっていましたが、諸般の事情で日本時間生物学会が再びホスト学会としてお世話することになりました。経緯等の詳細については、本誌をご覧ください。

また、2年先のことですが、2009年に第6回アジア睡眠学会が大川匡子日本睡眠学会理事長(大川先生は日本時間生物学会の理事でもあります)の主宰で、大阪で開催されます。アジア睡眠学会は10を超えるアジア各国の睡眠学会の連合体で、世界睡眠学会連合の傘下団体です。この度、大川大会長から日本時間生物学会に対して、アジア睡眠学会との連携大会開催の可能性が打診されました。日本時間生物学会理事会で検討した結果、2009年の学術大会をアジア睡眠学会と連携して開催することが決まりました。日本時間生物学会も、今後アジアの時間生物学者と積極的に連携していきたいと考えております。大会の日時は10月上旬と聞いています。今秋の理事会までに、大会長や日程を決めて会員の皆さんにご報告したいと思います。

日本時間生物学会は会員数(約600名)の割には学会参加者や、演題発表数が多い、小なりといえども非常に活発な学会です。純粋に学術的な学会としては丁度良いサイズの会かも知れません。この活性を維持するとともに、会員の相互刺激を通じて、日本の時間生物学をさらに発展させて行きたいと思えます。会員の皆さんのご活躍を祈念致します。

抗癌薬の時間治療

大戸茂弘¹⁾

九州大学大学院薬学研究院薬剤学

生体には体内時計が存在し、多くの生体機能をコントロールしている。そのため約24時間を周期とする生体リズムが認められる。また、薬の効き方を決定する薬の体内での動き方や薬に対する生体の感じ方も生体リズムの影響を受ける（時間薬理学：Chronopharmacology）。時間薬理学は、投薬のタイミングを考慮して効果を最大に、また副作用を最小にすることにより医薬品適正使用の向上を指向した学問分野である。一方、抗癌薬の薬物治療において、癌細胞に対し抗腫瘍効果を最大にする点と正常細胞に対し毒性を最小にする点が重要である。従って、生体の中で細胞の感受性や薬物動態が時間と共に刻々と変化しているような状況下では、生体リズムにあわせ持続点滴速度を変化させたり、適切な投薬タイミングを選択する必要がある。抗癌薬の効果の標的臓器となる癌細胞や副作用の標的臓器となる正常骨髄細胞のDNA合成能には日周リズムが存在する。そのため生体リズムを考慮して、抗癌薬の効果を増強し、副作用を軽減することが可能となる。治療において、抗癌薬に対する生体の感受性（癌細胞および正常細胞の細胞動態）および薬物動態の日周リズムをモニターし、生体リズムの中で何を指標に投薬タイミングを設定するかが重要である。生活環境、疾患症状、治療状況により生体リズムの位相や振幅が変容するため、投薬時刻が重要なのではなく個々の生体リズムにマッチした時刻に投与する必要がある。

1. はじめに

生体には体内時計が存在し、多くの生体機能をコントロールしている。そのため約24時間を周期とする生体リズムが認められる。また、薬の効き方を決定する薬の体内での動き方や薬に対する生体の感じ方も生体リズムの影響を受ける^{1, 20, 28)}。従って投薬タイミングを考慮することにより薬の有効性や安全性を高めることも可能となる。抗癌薬も代表的薬物の一つである。一般に抗癌薬の効果は、薬物動態、薬力学および癌細胞の感受性により規定される。また感受性は、癌細胞の増殖状態、細胞周期によって異なることが知られている。一方、抗癌薬の薬物治療において、癌細胞に対し抗腫瘍効果を最大にする点と正常細胞に対し毒性を最小にする点が重要である。しかし強力な抗癌薬は開発されているものの、その重篤な副作用のため治療を中断せざるを得なくなり、その作用を発揮できない場合が多い。抗癌薬は殺細

胞作用様式から、濃度依存性作用群（type I）と時間依存性作用群（type II）に分類される²⁶⁾。濃度依存性作用群には、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、白金誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤などの周期特異性薬剤が分類され、一回大量投与方法または中等量間欠投与方法が有効である。時間依存性作用群には、代謝拮抗剤や植物性アルカロイドなどの期特異性薬剤が分類され、長期頻回分割投与方法、持続点滴投与方法または間欠投与方法が有効である。以上が抗癌薬のcell kill kineticsからみた一般に推奨されている投与方法である。しかしながら、生体の中で細胞の感受性や薬物動態が時間と共に刻々と変化しているような状況下では、生体リズムにあわせ持続点滴速度を変化させたり、適切な投薬タイミングを選択することにより、効果を増強することや副作用を軽減することも可能である。

①ohdo@phar.kyushu-u.ac.jp (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

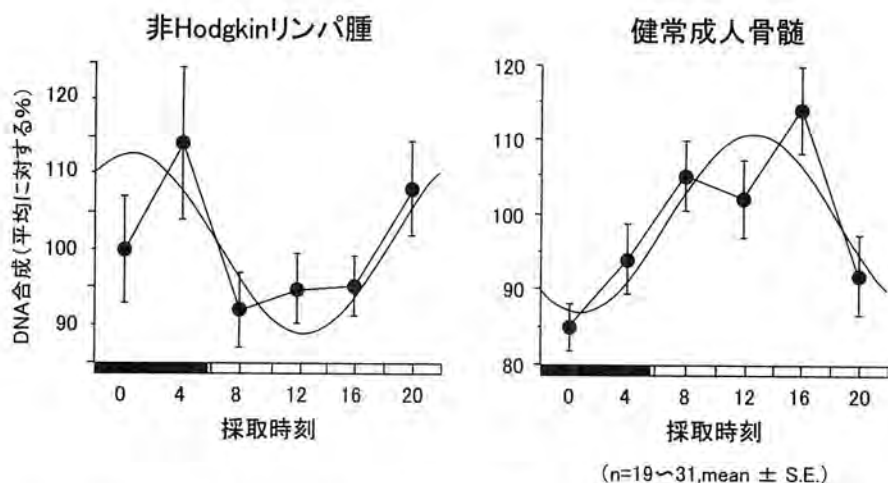


図1 非Hodgkinリンパ腫瘍患者（18名男子、6名女子）および健常成人（男子16名）を対象とした骨髄細胞のDNA合成能の日周リズム²⁷⁾。24時間の全データ平均を100%とし、各時点毎に平均と標準誤差（%）を示す。

2. 薬物活性の日周リズム

多くの薬物の効果、副作用および薬物動態が、投薬時刻により異なることが知られている。その機序としてレセプター機能、神経伝達物質などの生体の感受性や吸収、分布、代謝、排泄などの薬物動態の日周リズムが関与している。さらに、薬物動態の日周リズムの機序として肝機能、腎機能、薬物結合蛋白量、胃内pH、薬物の胃内通過時間などの日周リズムが関与している¹⁾。抗癌薬の共通した副作用として骨髄抑制や消化管障害がある。すなわち、活発に増殖を繰り返している骨髄細胞や消化管細胞は抗癌薬による副作用の標的臓器となりうる。健常人の骨髄細胞のDNA合成能には、活動期に高値を、休息期に低値を示す有意な日周リズムが認められる（図1）²⁷⁾。同様の所見は、直腸粘膜細胞でも認められる⁵⁾。一方、癌細胞のDNA合成能にも日周リズムが認められる²⁷⁾。すなわち、生体内では抗癌薬に対する細胞の感受性が時間と共に変化していることが推察される。実際に、S期特異性薬剤であるメトトレキサートや塩酸イリノテカンの抗腫瘍効果や副作用および抗癌薬と併用される顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の白血球増加作用は、癌細胞や正常細胞の細胞動態（DNA合成、標的酵素、レセプター数）や薬物動態の日周リズムと関連して投薬時刻により変化する^{21, 22, 24)}。

3. 抗癌薬の時間薬物治療の具体例

種々の抗癌薬に関して時間薬理学的所見が報告されているため薬力学的側面および薬物動態学的側面

から紹介する²¹⁾。

3-1. 6-メルカプトプリン、メトトレキサートの併用療法

急性リンパ球性白血病小児患者を対象とした6-メルカプトプリン、メトトレキサートの併用療法に関する臨床試験成績について紹介する²⁵⁾。維持療法として、6-メルカプトプリンを毎日、メトトレキサートを一週間毎に、ビンクリスチンとプレドニゾロンを一ヶ月毎に投与している。朝投与では、6-メルカプトプリンおよびメトトレキサートが午前10:00時に投与された。一方、夜投与では、午後17:00時以降に投与された。その結果を図2に示すが、78週以上再発が認められない患者の生存率は、朝投与で82例中38例で46%であった。一方、夜投与では36例中23例で64%と有意に高い。これらの機序として、まず生体の感受性の側面より、毒性の標的臓器である骨髄および消化管粘膜のDNA合成能には、活動期に最高値を示す有意な日周リズムが認められる⁵⁻²⁷⁾。DNA合成リズムと関連して合成能が低下する時間帯にはS期特異性薬剤である6-メルカプトプリンおよびメトトレキサートの毒性が軽減できるため増量が可能である。次に薬物動態学的側面より、両薬物の血中濃度は、いずれも夜間投与時に高まる方向に薬物動態値が寄与している。以上の結果を考慮すると、夜間投与時は正常細胞のDNA合成能が低下している時間帯であり、薬物濃度を高濃度に維持することが可能となり、毒性を誘発することなく、効果の増強につながったものと思われる。

対象：
急性リンパ球性白血病の小児患者(118名)

投薬時刻：
朝投与(82名)、夕投与(36名)

薬剤：
6-メルカプトプリン(6-MP、1回/日)
メトトレキサート(MTX、1回/週)
ピンクリスチン、プレドニゾン(1回/月)

—— ;朝投与
..... ;夕投与

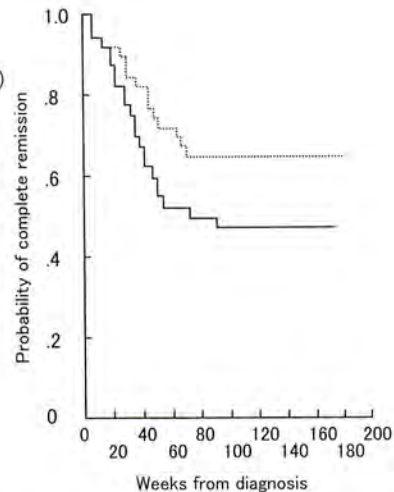


図2 急性リンパ球性白血病の小児患者を対象とした時間薬物治療の有効性の評価²⁵⁾。実線；朝投与、点線；夕投与。

3-2. フルオロウラシル、オキサリプラチン、ロイコボリンの併用療法

大腸癌患者を対象としたフルオロウラシル、オキサリプラチン、ロイコボリンの併用療法に関する臨床試験成績について紹介する¹⁵⁾。投与方法は、点滴速度を一定にした場合(24時間を通して一定量)と不定にした場合(フルオロウラシル、ロイコボリンを午前04:00に最大量、オキサリプラチンを午後16:00に最大量とした時間薬物治療)で比較検討している(図3)。表1に示すように、50%以上の腫瘍の縮小を示す奏効率は、時間治療で有意に高い。また重篤な消化器障害や神経障害のため治療を中断あるいは中止した症例は、時間治療で有意に軽減される。これらの機序として次のことが考えられる。まず生体の感受性の側面より、毒性の標的臓器である骨髄および消化管粘膜のDNA合成能には、活動期に最高値を示す有意な日周リズムが認められる^{5,15,27)}。DNA合成リズムと関連して合成能が低下する時間帯にはS期特異性薬剤であるフルオロウラシルの毒

性が軽減できるため増量が可能であり、逆にDNA合成能が高まる時間帯には毒性が増強されるため減量する必要がある。次に薬物動態学的側面よりフル

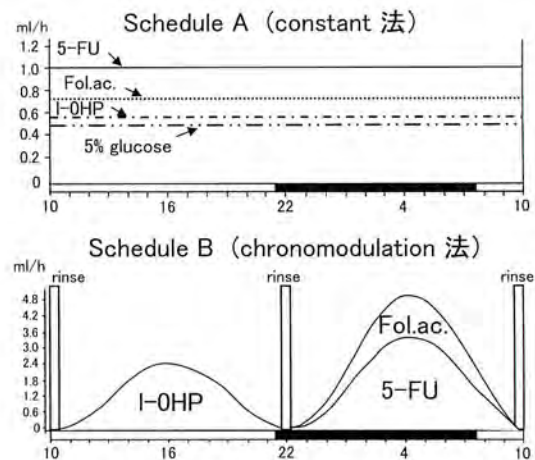


図3 大腸癌患者を対象としたクロノポンプによる時間薬物投与計画¹⁵⁾。5-FU；フルオロウラシル(600mg/m²)、Fol.ac.；ロイコボリン(300mg/m²)、I-0HP；オキサリプラチン(20mg/m²)、5日投薬+16日休薬

表1. 大腸癌患者を対象とした投与方法による効果および副作用の比較¹⁵⁾

指標	投与方法		統計解析
	一定速度	不定速度 (時間治療)	
患者数 (効果)	93	93	
50%以上の腫瘍縮小 (副作用)	27 (29%)	< 47 (51%)	P<0.05
中止,中断した症例	47 (51%)	> 26 (28%)	P<0.01
粘膜炎	70 (76%)	> 13 (14%)	P<0.01
末梢神経障害	29 (31%)	> 14 (16%)	P<0.01

オロウラシルを代謝するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) 活性は休息期に最高値を示すが、薬物濃度は最低値を示す。DPD活性が低下する時間帯にはフルオロウラシルの減量が必要で、逆にDPD活性が高まる時間帯には増量が可能である。またシスプラチンによる吐き気や腎毒性は夕投与時と比較して朝投与時に高く、シスプラチンの腎からの排泄量の投薬時刻による差異が関与している¹⁰⁾。

3-3. ドキソルビシン、シスプラチンの併用療法

表2は、卵巣癌患者 (FIGO stage III, IV、年齢29-87歳) を対象に治療効果および延命効果を指標に時間薬物治療の有効性を検討した結果である¹⁰⁾。9ヶ月間28日あたり60mg/m²のドキソルビシンおよびシスプラチンが投与された。投薬時刻を考慮しない方法 (U法)、06:00時にドキソルビシン、18:00時にシスプラチンを投与する方法 (A法)、06:00時にシスプラチン、18:00時にドキソルビシンを投与する方法 (B法)、一ヶ月毎にA法およびB法を交互に使用する方法 (A/B法) の4方法間で比較検討している。その結果、投薬時刻を考慮した時間薬物治療により延命効果が有意に改善する。またA法と比較してB法では、投与量を減量したり投与継続が困難な症例や出血および感染のため輸血を必要とする症例の頻度が、有意に増加する。これらの機序としてドキソルビシンによる骨髄毒性は06:00時投薬と比較して18:00時投薬で高く、これにはドキソルビシンのクリアランスの投薬時刻による差異が関与している。またシスプラチンによる吐き気や腎毒性は18:00時投薬と比較して06:00時投薬で高く、シスプラチンの腎からの排泄量の投薬時刻による差異が関与している¹⁰⁾。

以上のように種々の抗癌薬の効果や副作用が投薬時刻により異なり、その機序としてDNA合成能や

薬物動態の日周リズムが関与している。一方、腫瘍マーカーや副作用の指標である白血球数にも有意な日周リズムが存在する。また薬物濃度も投薬時刻により異なる。そのため薬効評価やTDM (治療学的薬物モニタリング) の実施に際し、採血時刻に十分注意しなければ、誤った評価につながるであろう。

4. 体内時計の分子機構からみた治療の可能性

現在、添付文書などに投薬時刻が明示されるに至っているが、時間治療をさらに展開させる上で、生体リズムに個体差が存在する点が大きな支障となっている。そのため、これまで蓄積された時間薬理学的所見を整理して体系化していくことが必要となる。このような背景から、時計遺伝子に関する情報に基づき時間治療の今後の展開について紹介する。

最近の創薬研究においては、ゲノム情報の解析に関する最新の技術を応用して、各種疾患の成因に関連する蛋白を同定し、それらに対する特異的な分子標的治療薬を開発することが望まれている。これに伴い創薬研究は、従来の天然物の化学構造修飾から分子標的あるいはゲノム情報に基づいた研究に大きくシフトしている。特に抗癌薬の開発では、従来の化学療法剤ほど強い副作用を示さずに臨床効果を示すことから、分子標的治療薬への期待が高まっている。こうした状況の中で、癌細胞の増殖および血管新生に関わる血管内皮細胞増殖因子に日周リズムが存在し、時計遺伝子により制御されていることが明らかとなった^{11,18)}。Sarcoma180、Lewis lung carcinoma、B16 melanomaの各種瘍を移植したマウスを対象に、血管新生阻害薬は、明期 (休息期) 開始時刻である07:00投薬において、暗期 (活動期) 開始時刻である19:00投薬と比較してより高い抗腫瘍効果を示す¹⁸⁾。さらに、Sarcoma180の腫瘍血管新生に対して、抗腫瘍効果が増強された07:00投薬時におい

表2. 卵巣癌患者を対象とした抗癌薬の効果に及ぼす投薬時刻の影響¹⁰⁾

投与方法	患者数	延命効果 (月数の中央値)	60ヶ月目 の生存率 (%)
U法	15	17	0
A法	17	42	50
B法	20	32	11
A/B法	11	82	78

U法：投薬時刻を考慮しない方法

A法：06:00時にドキソルビシン、18:00時にシスプラチンを投与する方法

B法：06:00時にシスプラチン、18:00時にドキソルビシンを投与する方法

A/B法：一ヶ月毎にA法およびB法を交互に使用する方法

て、19:00投薬と比較してより高い血管新生阻害効果を示す。その機序として、血管新生阻害薬の標的酵素の一つであるMetAP2（メチオニンアミノペプチダーゼ2）の腫瘍組織内における活性は、暗期後半から明期前半に高値を示す有意な日周リズムを示す。さらにMetAP2の活性は、抗腫瘍効果および血管新生阻害効果が増強した07:00投薬において、19:00投薬と比較して有意に抑制される。*MetAP2* mRNAの転写には、時計遺伝子のFeedback loop機構が関与しており、この振動体が刻むリズムによって*MetAP2*の発現に日周リズムが生じている可能性が示唆された。生体リズムの分子機構をふまえた血管新生阻害薬の時間治療を考えた場合、MetAP2の活性が上昇する明期前半に投薬することで、血管新生阻害薬が効果的に作用し、より高い抗腫瘍効果が得られると考えられる。このような時間生物学的な観点からのゲノム創薬のアプローチは、癌治療における新たな分子標的治療薬の創製に重要であり、分子標的治療薬の時間治療への今後の展開が期待される。その他の作用機序をもつ薬物に関しても同様の所見が認められる¹¹⁾。またこのような増殖因子は腫瘍で過剰発現しており、このリズムを診断することにより、種々の分子標的治療薬の抗腫瘍効果を増強できる至適投薬タイミングを設定することが可能である。一方、正常細胞の分裂リズムを制御している*Wee1* 遺伝子も時計遺伝子により制御されており、このリズムを診断することにより、種々の抗腫瘍薬の副作用を軽減できる至適投薬タイミングを設定することが可能である¹⁷⁾。今後種々の標的分子およびレセプターなどの日周リズムの成因を解明することにより、薬力学的側面から投薬タイミングを設定するための生体リズムマーカーを抽出することも可能となろう。

抗癌薬の抗腫瘍効果および副作用は、薬力学的側面のみならず薬物動態学的側面により影響を受ける。肝臓は薬物代謝や解毒を行う重要な臓器である。肝臓では多くの遺伝子が日周リズムを示す。ラットの肝臓を対象としたマイクロアレイ解析の結果、3906の対象遺伝子の中で約30%の遺伝子が明瞭な日周リズムを示す⁷⁾。その中で約90%の遺伝子の振幅強度は1.5倍以下であり、67の遺伝子が明瞭な日周リズムを示す。これらは、遺伝子の転写、薬物代謝酵素、トランスポーター、シグナル伝達および免疫関連の遺伝子である。SCNや肝臓でリズムに発現している*Dbp*は出力系の遺伝子であり、時計遺伝子により制御されている^{29,30)}。すなわち*Dbp*の転写はE-

boxesを介してCLOCK-BMAL1により促進し、PERとCRYにより抑制される。DBPが肝臓におけるアルブミン遺伝子や数種のP450分子（steroid 15 α -hydroxylase (Cyp3a4)、coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5))の転写を制御し、転写活性が日周リズムを示す¹⁹⁾。PAR-domain basic leucine zipper (PAR bZip) 転写因子DBP、HLFおよびTEFのトリプルノックアウトマウスを用いた研究で、PAR bZipタンパクがcytochrome P450 enzymes、carboxylesterases、aminolevulinic acid synthase (ALAS1)、P450-oxidoreductase (POR)、sulfotransferases、glutathione-S-transferase (GST)、aldehyde dehydrogenases、UDP-glucuronosyltransferases、members of drug transporter familiesおよびconstitutive androstane receptor (CAR)のような薬物代謝および解毒に関わる多くの酵素の発現を制御していることが明らかにされている⁹⁾。PAR bZipタンパクは、CYP2A5、CYP2C50およびCES3のような解毒に関わる酵素の発現を制御している。PAR bZipタンパクにより制御され日周リズムを示すCARは、CYP2B10のような解毒に関わる酵素の発現を制御している。PAR bZipとCARの両タンパクは、病原体に対する防御機構に関わるALAS1やPORを制御している。今後種々の薬物代謝酵素およびトランスポーターなどの日周リズムの成因を解明することにより、薬物動態学的側面から投薬タイミングを設定するための生体リズムマーカーを抽出することも可能となろう。

生体リズムは、健康を保持・増進させる上でも重要な役割を果たしている。生体リズムの破綻が不眠や胃腸障害などを引き起こし、持続的に続くと精神疾患などの慢性的疾患を生じることもしばしばない。一方、薬物治療中に睡眠・覚醒のサイクル、コーチゾール、体温などの生体リズムが変容することが注目され始めている^{8,19)}。インターフェロン (IFN) は腫瘍および慢性肝炎治療などに幅広く使用されているが、重要な副作用としてリズム障害と関連の深いうつ状態、不眠、自殺などが報告されている^{1,3)}。IFN非投与時には、ヒトにおいてリンパ球数は08:00時頃に最低となり、22:00時頃に最高となるが、コーチゾール濃度は08:00時頃に最高となり、22:00時頃に最低となる。これらのリズムはIFNを08:00時頃に連日投与するとリンパ球数は低値を維持し、コーチゾール濃度は高値を維持する。すなわち正常なリンパ球数とコーチゾール濃度の逆相関関係は崩れリズムは消失する。一方、IFNを22:00時頃に隔日投与

すると正常に維持される。以上の結果は、IFNを夜間に投与し、かつ隔日に投与することが生体リズムを崩さない理想的な投与方法であることを示している。しかしながら、IFNの生体リズム障害の機序については明らかにされていない。そこで、マウスを対象に、体内時計の本体である視交叉上核の時計遺伝子の日周リズムが薬物投与中に如何に変容するかを明らかにすること、および時計遺伝子の日周リズム障害を克服するための至適投薬設計を構築することを目的に以下の検討を行った。マウスを対象として、IFNによる生体リズムの障害が末梢のみならずSCNでも認められることを明らかにした^{12,23)}。薬物非投与時にはSCNの*Per1*、*Per2*、*Per3* mRNA発現量はそれぞれ明期（休息期）前半、後半、中間に最高値を示す。一方、IFNの連続投与によりそれらのリズムの振幅は顕著に低下する。*Per*遺伝子の転写促進因子である*Clock* および*Bmal1*のmRNAも抑制される。IFNによる時計機能障害は活動期前半の投薬で認められるが、休息期前半の投薬では認められない。この結果は上記ヒトでの所見と類似している。またSCNにおけるIFNレセプターには活動期に高値を示す有意なリズムが存在するため、時計機能障害の投薬時刻による差の機序として考えられる¹⁶⁾。このような現象は他の薬剤でも認められ、生体リズムの障害が発癌の頻度を高めることも知られている。そのためIFN以外の薬物に関しても生体のホメオスタシス機構を維持しながら治療していくことが、副作用、合併症の防止という点で極めて重要である。本研究結果は、薬が体内時計の時計遺伝子に異常を引き起こす可能性があること、そして、このような有害反応は投薬スケジュールを最適化することで避けることができ、またそうすべきであることを示している。

種々の薬物が、体内時計に作用し、生体リズムの位相を変化させる。光刺激は主観的暗期に特異的に体内時計の位相を変化させるが、多くの非光刺激は明期に作用して体内時計をリセットする。このような非光同調因子としては、薬物、制限給餌などが知られている。例えば、摂食条件を繰り返し操作することにより、末梢での時計遺伝子の日周リズムが摂食時間帯に応じて変化することが知られている⁹⁾。逆に薬物や摂食条件を操作することにより、生体リズムを調整したり、意図的に変化させることも可能である。すなわち、先に記載した生体リズム診断に基づき生体リズムに応じて至適投薬タイミングを設定する従来の時間治療に対し、生体リズムを積極的

に操作することにより至適投薬タイミングを容易に設定可能な新規時間治療法の開発につながるものと思われる。

以上のように、体内時計の分子機構を考慮することで、生体リズムマーカーのモニタリング、薬物誘発リズム障害の防止および生体リズムの操作を基盤にした時間治療が効率よく行われることが期待される。

5. おわりに

種々の抗瘍薬の効果、副作用の日周リズムについて紹介し、その機序を生体の感受性および薬物動態の側面より紹介した。治療に際し、少なくとも以下の点を考慮して治療指針を構築すべきであろう。

1) 抗瘍薬に対する生体の感受性および薬物動態の日周リズムが如何に制御されているか、治療においていずれが相対的に重要であるか、生体リズムの中で何を指標に投薬タイミングを設定するかが重要である。そのため疾患の症状、薬に対する生体の感受性、薬物動態の日周リズムの制御機構を解明することが急務である。

2) 生体の感受性の側面から細胞動態（細胞周期や標的酵素の動き）の日周リズムが、正常細胞と癌細胞との間で同じか異なるか（リズムの位相が同じか異なるか）が重要である。位相が異なる場合は正常細胞の感受性が低く、癌細胞の感受性が高い時刻に投薬することが望ましい。位相が同じ場合は、薬物を用い細胞動態を制御することにより細胞種間に位相の差異を見いだすことも可能である。

3) 対象が患者であるため生活状態、病状および輸液や薬物の投与方法によりリズムの位相や振幅が変化する。このように生体リズムの位相や振幅が個人毎に異なるため、投薬時刻が重要なのではなく個々の生体リズムにマッチした時刻に投与することが重要である。

基本的には、上記の点を考慮し、最終的には、効果および副作用の日周リズムに及ぼす生体の感受性と薬物動態の日周リズムの相対的寄与を考慮した上で、最適投与方法および投薬タイミングを設定することが重要である。これまで経験的に行われている1日2回あるいは3回均等分割する投薬設計を、生体リズムを考慮して治療効果が望まれる時間帯に高用量、不必要な時間帯には投与量を減量するといった試みだけでも医薬品適正使用の向上につながるであろう。多くの生体機能や疾患に日周リズムが認められるため、個々の生体リズムにマッチした投薬タ

イメージ、投与方法、製剤の工夫が望まれる。薬物療法最終ゴールが治療の個別化であるならば、個々の生体リズムにマッチした至適投薬設計を構築することが必要不可欠といえよう。

引用文献

- 1) Abrams PG, McClamrock E, Foon KA: *New Engl J Med* 312:443-444(1985)
- 2) Bjarnason GA, Hrushesky WJM: *Circadian Cancer Therapy*, pp 241-263, CRC Press Inc, Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo (1994)
- 3) Bocci V: *Cancer Drug Deliv* 2:313-316(1985)
- 4) Bruguerolle B: *Clin Pharmacokinet* 35:83-94(1998)
- 5) Buchi KN, Moore JG, Hrushesky WJM, Sothorn RB, Rubin NH: *Gastroenterology* 101:410-415(1991)
- 6) Damiola F, Minh NL, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U: *Genes Dev* 14:2950-2961(2000)
- 7) Desai VG, Moland CL, Branham WS, Delongchamp RR, Fang H, Duffy PH, Peterson CA, Beggs ML, Fuscoe JC: *Mutation Res* 549:115-129(2004)
- 8) Duncan WC: *Pharmacol Ther* 71:253-312(1996)
- 9) Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U: *Cell Metab* 4:25-36(2006)
- 10) Hrushesky WJM, von Roemeling R, Sothorn RB: *Chronopharmacology: Cellular and Biochemical Interactions*, pp439-473, Marcel Dekker Inc, New York and Basel(1989)
- 11) Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, Aramaki H, Ohdo S, Soeda S, Shimeno H: *Cancer Res* 63:7277-7283(2003)
- 12) Koyanagi S, Ohdo S: *Mol Pharmacol* 62(6):1393-1399(2002)
- 13) Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler U, Bonfils C: *Mol Cell Biol* 19:6488-6499(1999)
- 14) Levi F: *From the Biological Clock to Chronopharmacology*, pp147-170, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart(1996)
- 15) Levi F, Zidani R, Misset JL: *Lancet* 350:681-686(1997)
- 16) Lundkvist GB, Robertson B, Mhlanga JDM, Rottenberg ME, Kristensson K: *NeuroReport* 9:1059-1063(1998)
- 17) Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H: *Science* 302:255-259(2003)
- 18) Nakagawa H, Koyanagi S, Takiguchi T, Kuramoto Y, Soeda S, Shimeno H, Higuchi S, Ohdo S: *Cancer Res* 64:8328-8333(2004)
- 19) Nishimura K, Kato H, Saito M: *J Nutr Sci Vitaminol* 38:117-125(1992)
- 20) Ohdo S: *Drug Metab Pharmacokinet* 22(1):3-14(2007)
- 21) Ohdo S, Arata N, Furukubo T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N: *J Pharmacol Exp Ther* 285(1):242-246(1998)
- 22) Ohdo S, Inoue K, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N: *Jpn J Pharmacol* 75:283-290(1997)
- 23) Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H: *Nature Med* 7:356-360(2001)
- 24) Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N: *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1383-1388(1997)
- 25) Rivard GE, Infante-Rivard C, Dresse MF, Leclerc JM, Champagne J: *Chronobiol Int* 10:201-204(1993)
- 26) 下山正徳: *癌と化学療法* 3:1103-1110(1976)
- 27) Smaaland R, Lote K, Sothorn RB, Laerum OD: *Cancer Res* 53:3129-3138(1993)
- 28) Smolensky MH, Labrecque G: *Pharmaceutical News* 4:10-16(1997)
- 29) Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H: *Mol Cell Biol* 20:4773-4781(2000)
- 30) Yan L, Miyake S, Okamura H: *J Neurosci Res* 59:291-295(2000)

キイロショウジョウバエ概日時計の温度サイクル同調機構

吉井大志¹・富岡憲治²

¹University of Regensburg, Institute of Zoology

²岡山大学大学院自然科学研究科

地球の自転によってもたらされる約24時間の温度サイクルは、光サイクルと共に概日時計にとって重要な同調因子である。しかし、概日時計がどのような機構によって温度サイクルに同調するのかは大部分未解明である。キイロショウジョウバエを用いた概日時計の研究はここ数十年のうちに急激な進歩をとげ、数個の時計遺伝子で構成される自己調節フィードバックループが振動の中心機構であることが明らかにされている。現在、われわれを含むいくつかの研究グループがキイロショウジョウバエを用いて、概日時計と温度との関係を研究しており、少しずつ温度サイクル同調機構が明らかにされつつある。キイロショウジョウバエの歩行活動リズムは恒明条件、温度一定下では無周期になるが、温度サイクル下ではその温度サイクルに同調したリズムを示す。時計突然変異系統では活動リズムの温度同調性が異常になること、時計タンパク質、時計遺伝子の周期的発現が温度サイクルに同調することから、温度同調機構の背後には自己調節フィードバックループが関与することが明らかにされた。また概日時計の温度入力系の研究も進められており、*norpA*と*nocte*の2つの遺伝子が温度入力系に関わる遺伝子であることが最近同定された。

1. はじめに

1971年にKonopkaとBenzerはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて、歩行活動リズムと羽化リズムが恒暗条件下で無周期、短周期、長周期のリズムになる突然変異体を3系統分離することに成功した¹⁾。それぞれの変異はX染色体の同じ遺伝子座に生じていたことから、その遺伝子を *period* (*per*) と命名し、それぞれの突然変異体を *period⁰* (*per⁰*)、*period^{short}* (*per^S*)、*period^{long}* (*per^L*) と命名した。この発見が概日時計機構を遺伝子レベルで明らかにしようとする研究の始まりと言える。1990年にはHardinらが *per* 遺伝子のmRNAが周期的に変動していることを発見し、概日リズムの背後にはフィードバックループ機構が関与していることを提案した⁷⁾。その後、次々と概日時計に関わる遺伝子が発見され、フィードバックループの構成因子(時計遺伝子)が徐々に明らかにされた。現在では相互に連結した2つのフィードバックループが存在することが提案されている(図1)⁸⁾。

フィードバックループの構成因子である *dClock*

(*dClk*)、*cycle* (*cyc*) の転写産物 dCLOCK (dCLK)、CYCLE (CYC) は 2 量体を形成し、*per*、*timeless* (*tim*) の転写を活性化させる。*per*、*tim* の mRNA 量は夕方 にピークに達し、翻訳されたタンパク質の発現量は夜の後半にピークに達する。*per*、*tim* の産物タンパク質 PERIOD (PER)、TIMELESS (TIM) は 2 量体を形成し、夜の後半に核内に移行し、dCLK-CYCの転写活性を抑制することで自身の転写を抑制する。この負のフィードバックが約24時間の

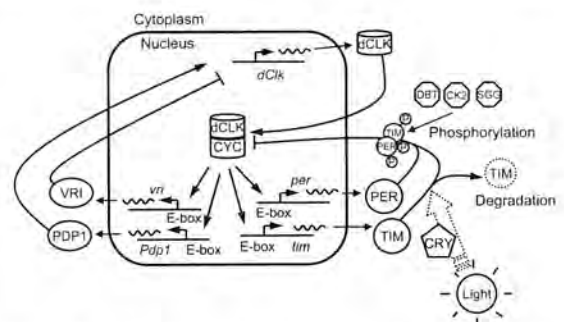


図1 キイロショウジョウバエ概日時計の分子モデル。詳細は本文を参照。

✉ x100dc@netscape.net (Universitaetsstrasse 31, 93053 Regensburg, Germany)

周期で循環することで、時計タンパク質PER、TIMの発現量が概日振動する。最近、このdCLK-CYCとPER-TIMにより構成される負のフィードバックループに加えて、VRILLE (VRI)、PDP1が関与する2つ目のループが発見された²¹⁾。dCLK-CYCはper、timとほぼ同じ位相でvri、Pdp1の転写を活性化し、それぞれのタンパク質の発現は夕方にピークを持つ日周変動を示す。VRIはdClkの転写抑制因子であり、PDP1はdClkの転写活性化因子である。これらの転写因子によって、dClkが周期的に転写制御を受けている。PER-TIMのループとVRI、PDP1のループが互いに連結し、相互作用することによって、より安定な約24時間周期のフィードバックを生み出していると考えられる。

光は概日時計にとって最も重要な同調因子である。他の生物でもそうであるが、キイロシヨウジョウバエでも概日時計の光同調機構は、分子レベル、組織レベルでよく研究されている。最も強力な光同調経路は、脳内の青色光受容分子CRYPTOCHROME (CRY) を介した経路であると現在のところ考えられている⁶⁾。CRYは時計細胞内で光を受容するとTIMに結合し、TIMを分解に導く¹¹⁾。このTIMの分解によってPER-TIM2量体が減少し、フィードバックループがリセットされる。これが現在提案されているフィードバックループの光同調メカニズムの概要である。シヨウジョウバエでは、薄いクチクラを通して光が脳内に直接届くことから、複眼などのような外部光受容器よりも、時計細胞内で直接光を受容する経路が発達したのかもしれない。しかし、光入力経路はCRYだけではなく、外部光受容器である複眼、単眼、H-B (Hofbauer-Buchner's) eyeletも時計の光受容器として働いていることが明らかにされている¹⁹⁾。しかし、これら外部光受容器からの光情報が、どの時計タンパク質に作用して時計をリセットするのかはまだ未解明である。

温度も光と同様に、時計に影響を与える同調因子として知られている。一般に、同調の速さは温度サイクルの振幅に依存することや、温度パルス、温度ステップでも位相依存的な位相反応が生ずることが知られているが、概日時計の温度同調の分子機構に関する研究はほとんど進んでいない¹⁸⁾。本稿では、キイロシヨウジョウバエ概日時計の温度サイクルへの同調機構について現在報告されている研究を概説する。

2. 温度同調性

温度サイクルへの同調は、1968年にZimmermanらがウスグロシヨウジョウバエの羽化リズムで報告している³²⁾。しかし、キイロシヨウジョウバエでは、ようやく1993年にWheelerらにより、歩行活動リズムに温度同調性が見られることが報告されている²⁷⁾。Wheelerらは恒暗条件下で振幅1℃の25℃/26℃、振幅1.5℃の25℃/26.5℃、振幅3℃の25℃/28℃の温度サイクルをキイロシヨウジョウバエに与え、その歩行活動リズムを計測した。振幅1℃の温度サイクルではほとんど同調が見られなかったが、1.5℃、3℃と温度サイクルの振幅が大きくなるに従って同調する個体の割合が増えた。さらに、同調した個体の活動パターンを解析すると、温度低下開始時刻よりも2.5時間前から活動が増加することが明らかになった。これは、ハエが温度低下開始時刻を予知していることを示しており、温度変化に対する直接反応によって起こる活動変化ではなく、概日時計の温度サイクルへの同調であることが示唆された。

歩行活動リズム以外に匂い物質に対する触覚の感度リズムも温度サイクルに同調することが知られている。匂い物質に対する触覚電図 (electroantennogram; EAG) の振幅は、明暗サイクル下で昼低く夜高いリズムを示す¹³⁾。Krishnanらは恒暗条件下で27℃ 12時間: 18℃ 12時間の温度サイクルを与えて、EAGを計測したところ、EAGリズムは温度サイクルに同調し、その振幅は高温期に高く、低温期に低くなった¹⁴⁾。このリズムは、温度一定下に移行した場合にもその位相を保ったまま自由継続する。このことから、EAGの振幅が温度により直接影響を受けるのではなく、EAGリズムを駆動する時計が温度サイクルに同調していることは明らかである¹⁴⁾。高温期は昼に、低温期は夜に対応するので、高温期に感度が上昇するというこの結果は、明暗サイクル下でのEAGリズムと矛盾しているように思われるが、この理由は今のところ説明できていない。

キイロシヨウジョウバエは恒明条件下では歩行活動が無周期になることが知られている (図2A)¹²⁾。これには、複数ある時計間の脱同調によってリズムが消失しているという解釈と、恒明によって時計が停止しているという解釈がある。恒明、温度一定の条件下では、脳のどの時計神経細胞においてもPERタンパク質の周期的変動が観察されないことから、われわれは時計が停止しているという後者の説が正

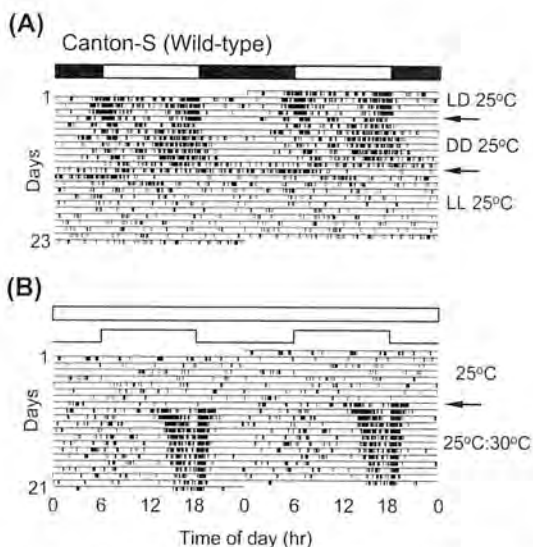


図2 キイロショウジョウバエ野生型 (Canton-S) の歩行活動を示したアクトグラム。(A) 明暗サイクル25°C一定の下で5日間歩行活動を記録した後、恒暗条件に移行し、さらにその後恒明条件に移行した。明暗サイクル下、恒暗条件下では明瞭なリズムが見られるが、恒明条件下では無周期になっている。(B) 恒明25°C一定の下で歩行活動を記録した後、温度サイクル(30°C:25°C 12hr:12hr)に移行した。25°C一定下ではリズムが観察されないが、温度サイクルに移行すると温度サイクルに同調したリズムが現れる。

しいのではないかと考えている。われわれのグループは1998年に、恒明条件下でもハエの歩行活動が温度サイクルに同調したリズムを示すことを報告した(図2B)²⁵⁾。この活動リズムも温度変化への直接反応ではなく、内因性の時計の温度サイクルへの同調によるリズムであることが以下の特徴により確認されている。1) 恒暗条件下の場合と同様に、温度低下開始時刻よりも前に活動が高まるという予知的活動を示す²⁵⁾。2) その予知的活動のピークは*per^S*突然変異系統では位相前進する²⁵⁾。3) 様々な周期の温度サイクル(T=32hr~8hr)を与えた場合に、活動ピークの位相が周期の長さに依存して変化する²⁶⁾。4) 恒明条件温度一定から温度サイクルに移行した場合、完全な同調までには数サイクルの移行期が必要である³⁰⁾。5) 温度サイクルの位相を数時間シフトした場合、再同調には数サイクルの移行期が必要である¹⁾。これらの事実から、恒明条件下でも温度サイクルによって時計が駆動すると考えられる。上述のように恒明条件下では通常ハエは無周期になるので、温度サイクル下で現れたリズムは温度サイクルが時計を駆動し、同調させることによるものであることは明らかである。われわれはこの現象を温度サイクル同調機構の解明のために利用できる

と考えている。

3. 分子メカニズム

TIMは、CRYが光を受容すると、プロテオソーム系によって分解される^{1,10)}。従って、恒明条件下ではTIMは恒常的に分解され、細胞質に蓄積しないことが想像される。これによってフィードバックループが停止し、歩行活動リズムが消失すると考えられる。上述の恒明条件下でも温度サイクルを与えることで活動リズムが回復する現象は、以下の2つの仮説で説明できる。1) 温度サイクルによって駆動する時計は既知のフィードバックループに依存しない新しい時計機構である。2) 温度サイクルには恒明条件下でもフィードバックループを駆動させる影響力がある。この2つの仮説を検証するために、われわれはまず無周期時計突然変異系統*per⁰¹*、*tim⁰¹*、*dClk^{JK}*、*cyc⁰¹*を用いて、温度サイクルに対する同調性を解析した^{25,30)}。これらの突然変異系統はすべて温度サイクルに同調したリズムを示したが、野生型の活動パターンとは大きく異なっていたことからPER、TIM、dCLK、CYCが温度サイクルへの同調に必須のタンパク質であることが明らかになった。従って、温度同調の背後にはフィードバックループが関与していることが予想された。

そこでわれわれは、抗PER抗体、抗TIM抗体を用いたウエスタンブロットにより、恒明温度サイクル下における時計タンパク質の周期的発現について解析を行い、フィードバックループが駆動しているかどうかを検討した。恒明温度一定下ではPER、TIMの発現量に周期的変動は見られず、どの時刻においてもほぼ一定になるが、温度サイクル下では明暗サイクル下と同様にPER、TIMが周期的に発現することが明らかになった(図3)³⁰⁾。この結果は、恒明下であっても、温度サイクルによってフィードバックループが駆動することを示唆している。Glaserらは*per*プロモーターの下流に*luciferase*を結合させた遺伝子を持つトランスジェニック系統を用いて、恒明温度一定下ではルシフェラーゼ活性に周期性は見られないが、温度サイクル下ではその温度サイクルに同調した周期的な活性が見られることを明らかにしている¹⁾。この結果もわれわれの結果と同様に温度サイクルによるフィードバックループの駆動を示唆している。しかし、なぜ温度サイクルによってフィードバックループが駆動されるのかは不明である。どのような経路(入力系)によって、どのように駆動される(フィードバックループの同調機構)

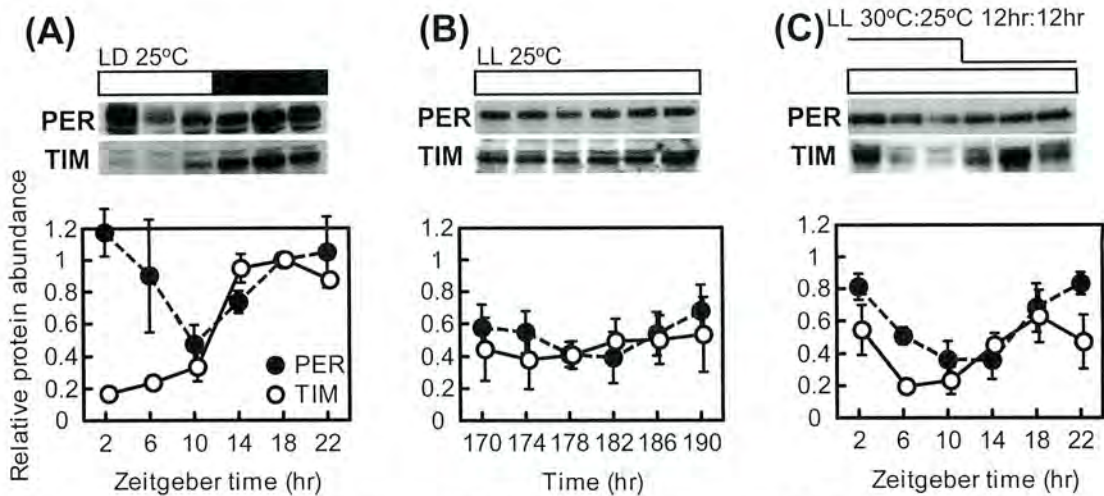


図3 明暗サイクル25°C一定下(A)、恒明25°C一定条件下(B)、恒明温度サイクル下(30°C:25°C 12hr:12hr)(C)における24時間のPER、TIMの発現パターンを示したWestern blotの結果。恒明25°C一定条件下ではPER、TIMの発現量はほぼ一定であるが、温度サイクル下では明暗サイクルと同様に周期的発現を示す。

のかを明らかにすることが今後の課題である。

Ederlyらの研究グループは、概日時計に対する温度の影響をいくつか報告している。彼らはまず、抗PER抗体、抗TIM抗体を用いたウエスタンブロットにより、PER、TIMタンパク質に対する熱パルスの影響を検討した²²⁾。25°Cで飼育したハエに37°Cの熱パルスを与えると、PER、TIMの発現量が急激に低下し、30分間の熱パルスでTIMはほぼ消失してしまい、PERもコントロールと比べると25%以下にまで低下した。彼らはその後、熱ショック遺伝子の転写活性化因子をコードする*Heat shock transcription factor*の突然変異体を用いて、熱パルスによるPER、TIMの分解にはheat shock系が関与しないことを明らかにしている²³⁾。また、Ederlyらは25°C一定、明暗サイクル下での歩行活動リズムに比べて、18°Cでは日暮れの活動ピークの位相が前進し、29°Cでは後退することを見出し、PER、TIMの発現パターンも活動リズムと同様に、18°Cでは位相前進し、29°Cでは位相後退することを見出した¹⁵⁾。これに関して、Majercakらは*per* mRNAの3' untranslated regionで温度依存的なスプライシングが起こり、低温下では高温下と比べてPERの発現ピークが位相前進することを明らかにしている。この温度依存的な*per*のスプライシングが温度サイクルの同調に関与している可能性については、Glaserらが否定しており、温度サイクル下ではアンスプライシング/スプライシングの割合が常に一定であることを明らかにしている⁴⁾。しかし、このような概日時計に関わる分子に対する温度の影響を詳細に検討することによって、

温度サイクルへの同調機構を明らかにする糸口がつかめるかもしれない。

われわれは最近、恒明条件下で、温度サイクルによる歩行活動リズムの駆動過程を明らかにするために、時計遺伝子mRNAレベルに対する温度ステップの影響を解析した。恒明条件下で20°Cから30°Cの温度ステップアップを与えた場合、*dClk* mRNA量は急激に増加し、*per*と*vri*は逆にmRNA量が急激に減少した。一方、30°Cから20°Cへの温度ステップダウンでは、それぞれの時計遺伝子のmRNA量は逆の反応を示し、*dClk*は急激に減少、*per*、*vri*は急激に増加した。また、*cyc*遺伝子は温度のステップアップ後もダウン後もmRNA量に変化はなかった。このことは、それぞれの時計遺伝子のmRNA量は温度の上昇、低下に対して別々の反応性を持つことを示している。温度サイクル下では温度上昇時と低下時に、時計遺伝子の発現量が補正され、正確に24時間周期の時計タンパク質の量的振動を引き起こすような仕組みになっているのかもしれない。温度変化に対する時計遺伝子発現の反応がどのような仕組みで生ずるのか、またそれがフィードバックループにどのように反映されるのかを今後明らかにせねばならない。

4. 温度サイクル同調に関与する脳内時計細胞

キイロショウジョウバエのPERは脳内で約150個程度の神経細胞で発現しており、それらの細胞は場所とサイズによっていくつかに分類される(図4)¹⁰⁾。前大脳背側の神経細胞群はDorsal neuron

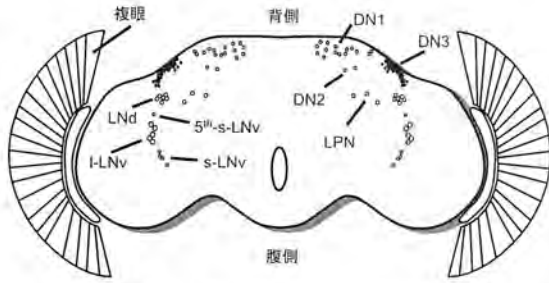


図4 脳内のPER陽性神経細胞を示した模式図。詳細は本文を参照。

(DN) と呼ばれ、それらはDN1、DN2、DN3の3つに分類されている。一方、脳側方部に位置する細胞群はLateral neuron (LN) と呼ばれ、それらはさらに背側の細胞群 (LNd)、腹側の大型の細胞群 (I-LNv)、小型の細胞群 (s-LNv) に分類される。時計の出力分子の一つと考えられているPigment dispersing factor (PDF) はI-LNvとs-LNvで発現している。これまでのところ、I-LNvの歩行活動リズムへの関与についてはほとんど証拠が得られていないが、s-LNvが歩行活動に関与することを示す結果は多く得られており、これらが最も重要なペースメーカーニューロンではないかと考えられている¹⁰⁾。RiegerらはPDFを発現しないs-LNv (5th s-LNv) を同定し、そのニューロンが歩行活動リズムに関与していることを示唆する結果を得ている²⁰⁾。われわれもCRYの機能欠損系統 cry^d を用いた研究から、LNv以外のPER発現細胞群も歩行活動リズムに関与していることを提案している²⁰⁾。これら以外の研究においてもしばしばs-LNv以外のPER発現細胞が歩行活動リズムに関与していることが示唆されていることから^{3, 8, 9, 24, 26)}、PDF陽性s-LNv以外のPER発現細胞群も歩行活動リズムに関与している可能性が強いと思われる。

われわれは歩行活動リズムの温度サイクル同調機構に関与する時計細胞を同定するために、抗PER抗体を用いた免疫組織化学により、恒明条件温度サイクル下でPERを周期的に発現する時計細胞の同定を試みた²⁰⁾。恒明条件温度一定下ではすべての時計細胞で、PERの発現が弱いかもしくは消失していたが、温度サイクル下では明暗サイクル下と同様に、ほぼすべての時計細胞群でPERの周期的発現が観察された。さらに脳葉側方後部の神経細胞群 (LPN) で強いPERの周期的発現が新たに観察された。次に、温度サイクルに同調した活動リズムにLN群が関与しているかどうかを明らかにするために、PDF陽性

のI-LNvとs-LNvに細胞死が誘導されるトランスジェニック系統 $pdf-Gal4/UAS-rpr$; hid とほぼすべてのLN群を失っている $disco$ 突然変異系統を用いて活動リズムの解析を行った。その結果、LN群を欠くハエでも温度サイクルに同調して歩行活動リズムを示すことが明らかになった。 $disco$ 突然変異体を用いて恒明温度サイクル下でPERの周期的発現を免疫組織化学により解析したところ、DN3とLPNのみで明瞭な周期的発現が観察できた。この結果は、温度サイクルに同調して歩行活動リズムを駆動するためには、DN3とLPNがあれば十分であることを示唆している。しかし、 $disco$ 突然変異体の歩行活動リズムは野生型のリズムと比べるとかなり不明瞭であったことから、LN群も重要な役割を担うと考えられる。LPNの役割についてはこれまでのところほとんど情報がなかったが、われわれの研究によって、LPNが温度サイクル同調のために特別な役割を持つ時計細胞である可能性が初めて示唆された。

5. 温度入力系

キロショウジョウバエの温度受容機構はほとんど研究が進んでいない分野であると言ってもよいだろう。Sayeedらは、走温性の解析から触角が温度受容器として重要な役割を果たしていることを明らかにし²¹⁾、続いてZarは触角には低温を感知する温度受容器があることを提案している³¹⁾。しかし、概日時計の温度サイクル同調性には触角は重要でないようである。Glaserらは上述のように、 $per-luciferase$ ($per-luc$) を導入したトランスジェニック系統の温度サイクル下でのルシフェラーゼ活性を触角のないハエで測定し、そのルシフェラーゼ活性が野生型同様に温度サイクルに同調して周期的に変化することを明らかにしている⁴⁾。さらにGlaserらはルシフェラーゼ活性が温度サイクルに同調しなくなる突然変異体のスクリーニングを行い、 $norpA$ ($no\ receptor\ potential\ A$) と $nocte$ ($no\ circadian\ temperature\ entrainment$) の2つの遺伝子が概日時計の温度受容に関与していることを示唆する結果を得た (図5)³⁾。 $nocte$ はX染色体に位置する遺伝子であることが分かっているが、まだ正確な遺伝子座は公開されていない。またその遺伝子のコードするタンパク質や脳内の発現場所なども分かっていない。 $norpA$ はPhospholipase C (PLC) をコードする遺伝子で、PLCはPhototransduction cascadeで Ca^{2+} の放出を引き起こすイノシトール3リン酸 (IP3) を生成する部分に関与している。つまり、 $norpA$ 遺伝子の温度受

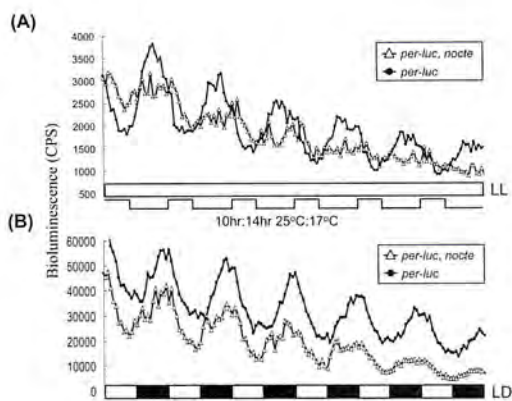


図5 温度サイクル下 (A) と明暗サイクル下 (B) における *per-luc*, *nocte* 突然変異系統のルシフェラーゼ発現の計測結果 (Glaser and Stanewsky (2005) より改変)。恒明条件、温度サイクル下 (10hr:14hr 25°C:17°C) (A) ではコントロール系統 *per-luc* は温度サイクルに同調した発光リズムを示すが、*per-luc*, *nocte* 系統の発光パターンに周期性は見られない。一方、明暗サイクル 25°C 一定下 (B) では両系統ともに明暗サイクルに同調した発光リズムを示す。

容への関与は、温度受容機構にも IP3 が関与するカスケードが存在することを示唆している。

Glaser らは、*per-luc* トランスジェニック系統の肢、羽、頭部、腹部、吻、脳をそれぞれ単離し、それぞれの器官におけるルシフェラーゼ活性を温度サイクル下で測定した⁴¹⁾。この結果、単離したすべての器官のルシフェラーゼ活性は温度サイクルに同調して、周期的に変化することが明らかになった。このことは、概日時計のための温度受容機構は頭部だけに存在するものではなく、からだの至るところに存在することを示している。一体どのような機構によって温度情報が時計に伝えられるのか、今後の発展が期待される。

6. 2 振動体モデルとの関係

Pittendrigh らは 1958 年にウスグロショウジョウバエを用いた研究により、羽化リズムは光感受性振動体と温度感受性振動体の 2 つの時計機構によって制御されていることを提案した¹⁷⁾。しかし、その後これら 2 つの振動体の正体について研究、考察している研究はほとんどなく、全く未解明のままである。われわれは、無周期時計突然変異体を用いた温度同調性の解析から、時計遺伝子 *per*、*tim* に依存しない振動機構が存在することを示唆する結果を得た²⁸⁾。*per*、*tim* の欠損突然変異系統 *per⁰¹*、*tim⁰¹* は恒暗温度サイクル下で内因性の時計によると思われる活動リズムを示した。一方、別の時計遺伝子 *dClk*、*cyc*

が機能欠損した無周期突然変異系統 *dClk^{dk}*、*cyc^{dl}* はそのような内因性のリズムは示さなかった。このことは、温度サイクル下では *per*、*tim* に依存しない *dClk*、*cyc* が関与する振動機構はたらくことを示唆している。この *per*、*tim* 非依存性時計機構が Pittendrigh の提案している温度感受性振動体に対応するかどうかに興味深い。また、脳内の PER 発現細胞の中に光感受性時計細胞と温度感受性時計細胞が存在する可能性も考えられる。われわれは上述のように、DN3 と LPN があれば、温度サイクルに同調して歩行活動リズムを駆動することが可能であることを明らかにした。このことは、DN3 と LPN が温度感受性の高い時計細胞であることを物語っている。特に LPN は、明暗サイクル下では明瞭な PER の発現が観察されないが、温度サイクル下では比較的強い PER の発現リズムを示す³⁰⁾。これは LPN が温度同調に関する特別な役割を担うことを示唆する。

7. 結び

概日時計の温度同調性の研究は始まったばかりであり、光同調性の研究と比べるとまだ発展途上である。しかし、現在のキョウジョウバエの研究技術や光同調性の研究で得られた知見を応用して研究を行えば、光同調性の研究に追いつくのもそう遠い話ではないと思われる。これまではわれわれの研究グループと Ralf Stanewsky のグループが温度サイクル同調性の研究を進めてきたが、現在は、その他いくつかの研究グループが温度同調性の研究に参入しているとのことである。このような流れも、研究を加速させる大きな要因となるに違いない。概日時計の温度同調には、重要な生物学的意義があると思われる。特にショウジョウバエのような小型の昆虫にとって極端な高温、低温は死活問題である。このような危険を回避するためには、光サイクルに同調するだけでなく、温度サイクルに同調し、危険な時刻を予測する必要があるだろう。もしかすると、温度は我々が考えている以上に概日時計にとって重要な同調因子なのかもしれない。今後も分子レベル、組織レベル、行動レベルで温度同調性の研究を進め、温度が同調因子として概日時計にどれほどの影響力を持つものなのかを明らかにしていく必要がある。

謝辞

図 5 の使用を許可してくれた Ralf Stanewsky と Franz Glaser に感謝いたします。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、岡山大学重点研究

プロジェクト「生命現象の多様なタイミング機構の総合的理解」の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P: *Science* 304:1503-1506 (2004)
- 2) Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J: *Cell* 112:329-341 (2003)
- 3) Dushay MS, Rosbash M, Hall JC: *J Biol Rhythms* 4:1-27 (1989)
- 4) Glaser FT, Stanewsky R: *Curr Biol* 15:1352-1363 (2005)
- 5) Grima B, Chelot E, Xia R, Rouyer F: *Nature* 431:869-873 (2004)
- 6) Hall JC: *Curr Opin Neurobiol* 10:456-466 (2000)
- 7) Hardin PE, Hall JC, Rosbash M: *Nature* 343:536-540 (1990)
- 8) Hardin PE: *J Biol Rhythms* 19:348-360 (2004)
- 9) Helfrich-Förster C: *J Comp Physiol A* 182:435-453 (1998)
- 10) Helfrich-Förster C: *Genes Brain Behav* 4:65-76 (2005)
- 11) Konopka RJ, Benzer S: *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2112-2116 (1971)
- 12) Konopka RJ, Pittendrigh CS, Orr D: *J Neurogenet* 6:1-10 (1989)
- 13) Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE: *Nature* 400:375-378 (1999)
- 14) Krishnan B, Levine JD, Lynch MK, Dowse HB, Funes P, Hall JC, Hardin PE, Dryer SE: *Nature* 411:313-317 (2001)
- 15) Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I: *Neuron* 24:219-230 (1999)
- 16) Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A: *Science* 285:1737-1741 (1999)
- 17) Pittendrigh CS, Bruce VG, Kaus P: *Proc Natl Acad Sci USA* 44:965-973 (1958)
- 18) Rensing L, Ruoff P: *Chronobiol Int* 19:807-864 (2002)
- 19) Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C: *J Biol Rhythms* 18:377-391 (2003)
- 20) Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Förster C: *J Neurosci* 26:2531-2543 (2006)
- 21) Sayeed O, Benzer S: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6079-6084 (1996)
- 22) Sidote D, Majercak J, Parikh V, Edery I: *Mol Cell Biol* 18:2004-2013 (1998)
- 23) Sidote D, Edery I: *Chronobiol Int* 16:519-525 (1999)
- 24) Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M: *Nature* 431:862-868 (2004)
- 25) Tomioka K, Sakamoto M, Harui Y, Matsumoto N, Matsumoto A: *J Insect Physiol* 44:587-596 (1998)
- 26) Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC, Stanewsky R: *Curr Biol* 13:1758-1767 (2003)
- 27) Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS, Hall JC: *J Biol Rhythms* 8:67-94 (1993)
- 28) Yoshii T, Sakamoto M, Tomioka K: *Zoolog Sci* 19:841-850 (2002)
- 29) Yoshii T, Funada Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K: *J Insect Physiol* 50:479-488 (2004)
- 30) Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K: *Eur J Neurosci* 22:1176-1184 (2005)
- 31) Zars T: *J Comp Physiol A* 187:235-242 (2001)
- 32) Zimmerman WF, Pittendrigh CS, Pavlidis T: *J Insect Physiol* 14:669-684 (1968)

概日リズム研究におけるルシフェラーゼとその応用

中島芳浩¹⁾、野口貴子¹⁾、池田正明^{2,3)}、近江谷克裕^{1,4)}¹⁾ 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門²⁾ 埼玉医科大学医学部³⁾ 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター⁴⁾ 北海道大学大学院医学研究科連携研究センター

発光タンパク質であるルシフェラーゼは、細胞内の遺伝子発現を定量的かつ長時間に渡りモニターするレポーター遺伝子として広く用いられている。極めて複雑な転写・翻訳制御機構で構成され、さらに他のライフサイエンス分野と比較して際立って長い測定時間を要する概日リズム研究では、ルシフェラーゼは欠かすことのできない必須ツールの一つとなっている。本稿では、概日リズム研究で用いられている3種類のルシフェラーゼアッセイ系（トランジェント、リアルタイム測定、シングルセルイメージング）の背景と現状について、ルシフェラーゼの特徴と併せながら解説をする。

1. はじめに

ライフサイエンス研究の発展は、その測定方法や解析技術の確立に大きく依存している。例えば Sanger法を基にする遺伝子解析技術や、Millisが考案した遺伝子増幅法の確立により、ゲノム解読をはじめとする遺伝子解析が飛躍的に進展した。概日リズム研究におけるルシフェラーゼテクノロジーについてもその例外ではない。リアルタイム測定法の確立と *Kai* 遺伝子の発見、シングルセルイメージング法の確立と細胞間リズム同調の発見などは先駆的な測定系の確立がブレイクスルーをもたらした良い例であろう。

発光レポーターであるルシフェラーゼは、細胞内で起こる遺伝子発現を簡便に測定するツールとして広く用いられている。概日リズム研究は、このレポーターの特徴を巧みに利用し、測定に用いている分野の一つである。ルシフェラーゼについては、近年、種々の発光生物から多数のルシフェラーゼ遺伝子が単離・同定され、遺伝子発現解析に用いられるルシフェラーゼの種類も増加している。

本稿では、哺乳類細胞系を中心に、概日リズム研究で用いられている3種の遺伝子発現解析系（トランジェントアッセイ系、リアルタイム測定系、シングルセルイメージング系）について、その原理と応

用例を紹介するとともに、論文には記載され難い、筆者らが経験した（抱えている）測定上の注意・問題点について、また遺伝子や測定装置の市販化の状況についても記載したい。

2. 生物発光とルシフェラーゼ

生物発光は、発光生物が発する可視光であり、その光の色（波長）も青～赤と多様である。発光生物には、細菌、キノコ、クラゲ、甲虫、魚など、多くの種がある。図1に我々の研究室で採取し、実験に

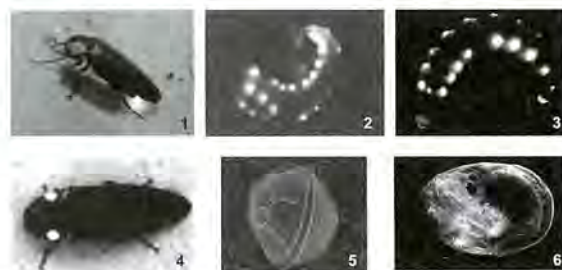
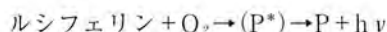


図1 様々な発光生物

1. ハイケボタル (*Luciola lateralis*)、丹羽一樹博士提供)、2. イリオモテボタル (*Rhagophthalmus ohbai*)、鈴木博文博士提供)、3. 鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*)、4. クリックビートル (*Phrixothrix hirtus*) (3, 4: Vadim Viviani博士提供)、5. 渦鞭毛藻 (*Lingulodinium polyedrum*)、6. ウミホタル (*Vargula hilgendorffii*) (5, 6: 小江克典博士提供)。

用いている発光生物を示した。

生物発光の分子機構は、発光基質（ルシフェリン：発光基質の総称）の酸化を発光酵素（ルシフェラーゼ：発光酵素の総称）が触媒する酵素反応である。一般的に、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は、



として表わされ、ルシフェラーゼの存在下、酸化によりルシフェリンの酸化物（P*）が励起状態へと変化し、これが基底状態に戻る際、分子内に生じた過剰なエネルギーが光として放出される。生物発光の特徴としては、高い発光量子収率であることが挙げられ、ホタルでは88%と報告されている¹⁷⁾。それ故、発する光は極めて発熱の少ない冷光である。またもう一つの特徴として、基質特異性が挙げられる。例えば図1-1~4の甲虫のルシフェラーゼは、渦鞭毛藻（図1-5）やウミホタル（図1-6）のルシフェリンを触媒せず、逆に渦鞭毛藻やウミホタルのルシフェラーゼは甲虫のルシフェリンを触媒しない。このような生物発光の特徴が、後述の発光レポーターとしての利点の1つであり、またこれらの特徴を巧みに利用した多種のルシフェラーゼアッセイ系が構築されている。なお、生物発光の化学・生化学的なメカニズムについては紙面の都合上省略したが、詳細については最近の総説を参照して頂きたい¹⁸⁾。

さて、種々の生体現象を解析するためのツールと

して、多種のレポーター遺伝子が用いられているが、各々長所・短所があり、全ての測定・検出が出来る完璧なレポーターは存在しない。そのため、それらの長所を活かし、目的にあわせて適材適所で使用することが大事である。レポーター遺伝子の代表格である蛍光タンパク質は、励起光を照射することで蛍光を発し、その強度もルシフェラーゼと比較して格段に高い。そのため、ミリ秒オーダーの非常に速い経時変化やタンパク質の細胞内局在のイメージングには絶大な威力を発揮する。一方、ルシフェラーゼはGFPと比較して、見かけ上の発光強度は低く、長時間（数十秒~数十分）の測定が必要となるため、ごく短時間で起こる変動を検出することは難しい。しかし、バックグラウンドが非常に低く、また測定系のダイナミックレンジも広いことから、GFPや他のレポーター遺伝子と比較して、最も高い定量性を示すと考えられる。さらに、ルシフェラーゼの発光は励起光を必要としないことから、照射による細胞障害あるいは光に感受性の組織や個体への影響を無視できる利点がある。

ここ2~3年でメーカーから購入可能なルシフェラーゼ、ルシフェリンが飛躍的に増え、これに伴い新たな測定方法の開発も精力的に行われている。表1に、市販されているルシフェラーゼとルシフェリンのリストを示す。最初に市販化された北米産ホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼとウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェラーゼは、現在発

表1 市販されているルシフェラーゼおよびルシフェリン

由来	遺伝子名	ルシフェリン	分子量 (kDa)	最大発光波長 (nm)	購入先
非分泌型					
ホタル	Luc(+), Luc2	ホタルルシフェリン	61	562	プロメガなど
レニーラ	RLuc	セレンテラジン	36	480	プロメガなど
クリックビートル (ジャマイカ産)	CBGluc	ホタルルシフェリン	60	537	プロメガ
クリックビートル (ジャマイカ産)	CBRLuc	ホタルルシフェリン	60	613	プロメガ
クリックビートル (ブラジル産)	ELuc	ホタルルシフェリン	61	540	東洋紡績
鉄道虫	SLR	ホタルルシフェリン	61	630	東洋紡績など
イリオモテボタル	SLO	ホタルルシフェリン	60	550	東洋紡績など
イリオモテボタル	SLG	ホタルルシフェリン	60	580	東洋紡績など
ビブリオ		FMNH2	80	490	-
分泌型					
コペポータ	Gluc	セレンテラジン	20	480	NEB
コペポータ	MetLuc	セレンテラジン	24	480	Clontech
ウミホタル	CLuc	ウミホタルルシフェリン	61	465	ATTO

光レポーター遺伝子として最も頻繁に用いられている。発光基質の違いを利用し、両者を併用するデュアルルシフェラーゼアッセイが、最も標準的なルシフェラーゼアッセイ法とされている。我々のグループで単離・改良したイリオモテボタル (*Rhagophthalmus ohbai*, 図1-2) ルシフェラーゼ、鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*, 図1-3) ルシフェラーゼは、発光色の違いを利用した新しいレポーターアッセイ系に用いられている。また同様のコンセプトに基づいたジャマイカ産クリックビートル (*Pyrophorus plagiophthalmus*) ルシフェラーゼも近年プロメガ社より発売された。我々が改良したブラジル産クリックビートル (*Pyrearinus termitilluminans*, 図1-4) ルシフェラーゼは、他のホタル系ルシフェラーゼよりも高い発光強度を示し、発光イメージング用ルシフェラーゼとして製品化された。また、市販化はされていないが、発光細菌 (*Vibrio harveyi*) ルシフェラーゼは多種の細菌における遺伝子発現検出に広く用いる。コベポータ (*Gaussia princeps*, *Matridia lpnga*) およびウミホタル (*Cipridina noctiluca*, 図1-6) ルシフェラーゼは、前述のルシフェラーゼとは異なり、分泌シグナルを有する分泌型ルシフェラーゼであり、細胞の培養液中のルシフェラーゼ活性を測定するアッセイ系に用いられている。

3. ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現の原理

ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現解析法の原理について簡単に述べる。解析したい転写調節領域 (プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど) をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入する。転写活

性を持たないシス配列やイントロンの影響を解析する場合は、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入されているTKやSV40などの恒常的プロモーターの上流に組み込む。これらのレポーターベクターを細胞に導入し、転写に伴って発現するルシフェラーゼの発光を大過剰のルシフェリンを添加することで測定する。微生物、魚類、植物、哺乳類、いずれの生物種における発光レポーターアッセイも、以上の原理に基づいている。

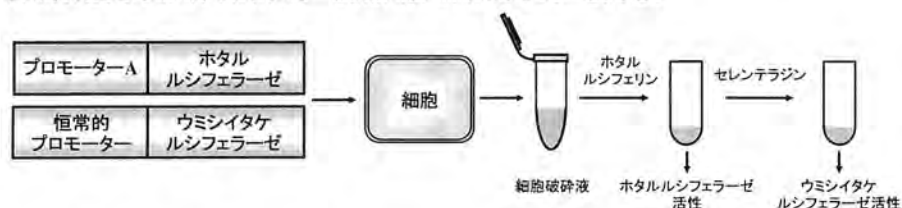
4. トランジェントアッセイ系

トランジェントアッセイ系は、測定の簡便さとハイスループットアッセイが可能である点から、一般にルシフェラーゼを用いた遺伝子発現解析系で最も汎用されている。この系では、レポーターベクターを細胞に導入し、一定時間経過後細胞を破砕し、遺伝子発現に伴うルシフェラーゼ活性を測定する。従来は、レポーターを一過的 (トランジェント) に細胞に導入するという意味でトランジェントアッセイと呼ばれたが、近年は後述のリアルタイム測定でも一過的な遺伝子導入が行われるため、本稿では細胞や組織を破砕し、ルシフェラーゼ活性を測定する細胞破砕系をトランジェントアッセイ系と定義する。以下に、2つのレポーターを併用するデュアルアッセイ系と、最近我々が開発した発光色の違いを利用したマルチカラーアッセイについて紹介する。

4-1. デュアルアッセイ

デュアルアッセイは、基質特異性など、レポーターの酵素特性の違いを利用し、2種のレポーターベクターを用いて転写活性を測定する系である。そ

(1) ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイ



(2) 赤・橙・緑ルシフェラーゼを用いたマルチカラールシフェラーゼアッセイ



図2 デュアルおよびマルチカラールシフェラーゼアッセイによるトランジェントアッセイのスキーム

の組合せは多様で、一方をルシフェラーゼ、他方をβ-ガラクトシダーゼなどのレポーター酵素を用いる場合もある。現在最も多く用いられている、ホタルとウミシイタケルシフェラーゼを併用するデュアルアッセイでは、解析したいプロモーター領域やシス配列をホタルルシフェラーゼに連結、テストレポーターベクターとし、一方で恒常的プロモーターをウミシイタケルシフェラーゼに連結し、内部コントロールベクターとしている。内部コントロールは、継代時の細胞数、トランスフェクション効率、細胞溶解効率など種々の実験操作で生じる誤差を修正するために非常に重要である。これら2つのベクターを細胞に同時に導入し、最初にホタルルシフェリンによりホタルルシフェラーゼ活性を測定、続いてセレンテラジンによりウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定する(図2-1)。プロモーター活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性の相対値として評価される。発光測定には、光電子増倍管が配置されたルミノメーターが用いられる。この系の利点は、1チューブ(あるいは1ウェル)内で2つのルシフェラーゼ活性が測

定できる点である。これは酸性のセレンテラジン溶液の添加により、発光しているホタルルシフェラーゼを消光させる原理に基づいている。

蛇足ではあるが、以前発光のキネティックを測定した際、測定中に突然発光強度が10~15%低下する現象が観察された。装置の電気ノイズなど慎重に原因を探ったところ、結局基質の添加時に生じる泡が鏡の役割をして、見かけ上の強度をかき上げしており、泡が破裂することで強度が低下することに気が付いた。測定結果を数値だけを見ていた時には気が付かなかったことである。細かいことであるが、精度低下の原因となるので操作上の注意点として参考までに記した。

4-2. マルチカラーアッセイ

前述のデュアルアッセイ系は、2つのルシフェラーゼのうち、一方を内部コントロールとして用いるため、1つの遺伝子の転写活性を相対的に評価するだけで、2つ以上の転写を同時にモニターすることは不可能である。細胞内で起こる複雑な転写調節機構を理解するには、複数の遺伝子発現を同時に解

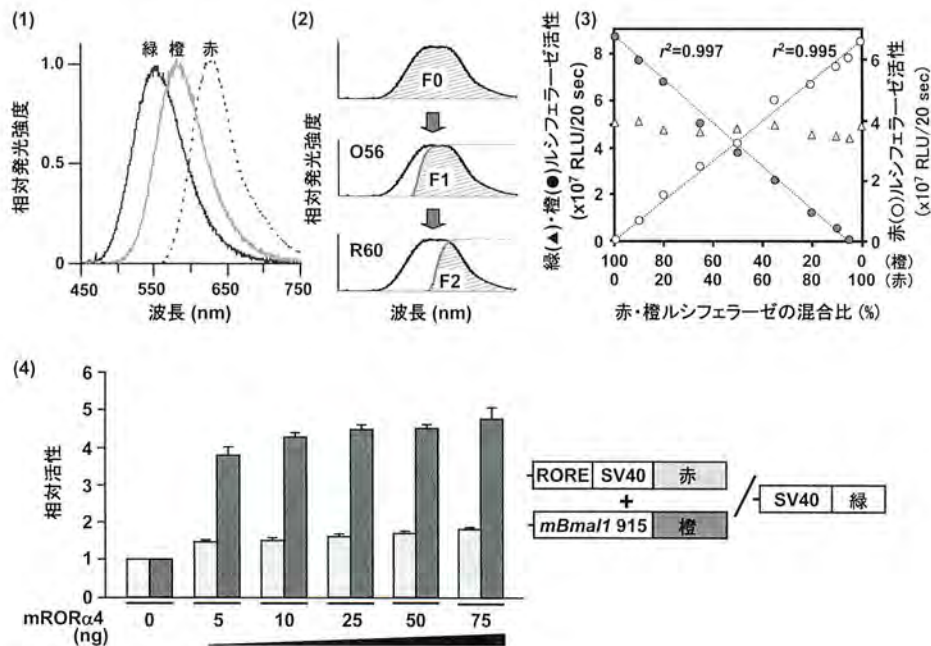


図3 緑、橙および赤ルシフェラーゼの色分離による同時定量

(1) NIH3T3細胞に発現させた緑、橙、赤ルシフェラーゼの発光スペクトル。(2) ロングパスフィルターを用いた発光測定スキーム。各図は緑、橙、赤ルシフェラーゼを等量混合した場合の発光スペクトルおよびロングパスフィルターの透過スペクトルを示す。上図：フィルター無しでの全光の測定。中図：O56フィルターによるF1値の測定。下図：R60フィルターを用いたF2値の測定。斜線部は各値の波長領域を示す。(3) 緑、橙、赤ルシフェラーゼを用いたアッセイ系の定量性。各々のルシフェラーゼの混合比を変えて、緑(▲)、橙(●)、赤(○)を同時に定量した(RLU: Relative Light Unit)。(4) マルチカラーアッセイを用いたRORα4によるmBmal1プロモーターおよびRevErb/ROR応答配列(RORE)の転写活性化の同時測定

析することが重要であるが、そのためには、さらにもう1つのルシフェラーゼをシステムに追加し、同時に3つのルシフェラーゼの発光活性を測定しなければならない。近年我々は、いずれもホタルルシフェリンを基質として発光するイリオモテボタル由来の緑ルシフェラーゼ (SLG)¹⁴⁾、その部位特異的変異体の橙ルシフェラーゼ (SLO)²⁴⁾、および鉄道虫由来の赤ルシフェラーゼ (SLR)²⁵⁾ をレポーターとして用い、各々の発光スペクトルを光学フィルターで分離・定量することにより、2つもしくは3つの転写活性を同時に測定する方法を開発した^{14,15)}。

このアッセイ系では、緑・橙・赤ルシフェラーゼのうち2つをテストレポーターに、1つを内部コントロールに用い、2つのテストレポーターの活性を内部コントロールレポーターで補正することにより、2つの転写活性を同時に測定することを想定した (図2-2)。図3-1に各ルシフェラーゼの発光スペクトルを示す。ホタルをはじめとする甲虫由来のルシフェラーゼは、測定溶液のpHに連動して、色を変えるものと、変えないものがある。前者は前節のデュアルアッセイ系で記載したホタルルシフェラーゼである。これに対し、イリオモテボタル、鉄道虫由来ルシフェラーゼは後者のタイプであり、発光色を分離・定量化するアッセイ系に適している。図3-2は光学フィルターを用い、3色の発光を測定するスキームを示す。光学フィルターには、ルシフェラーゼから発する光を効率良く捉えるため、特定波長以上の光を透過するロングパスフィルターを採用した。スペクトルは、3色のルシフェラーゼの発光強度が等しくなるように混合した時の図である。測定は、最初にフィルターの無い状態で全体の発光値 (F0) を、続いて短波長側のフィルター (O56) を透過する発光値 (F1)、最後に長波長側のフィルター (R60) を透過する発光値 (F2) を測定し、各々の値を次の連立式に導入することで各ルシフェラーゼの活性を算出する。ここでは各ルシフェラーゼに対するフィルターの透過率 (κ) は装置固有の固定値であるので、F0、F1、F2を測定するだけでそれぞれの活性 (G: 緑、O: 橙、R: 赤) が算出できる。

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{O56} & \kappa O_{O56} & \kappa R_{O56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

この方法で実際に各ルシフェラーゼの活性が評価できるかを、ルシフェラーゼを単独に発現させた各々の細胞破碎液の混合比を変えて測定した。この

際、緑ルシフェラーゼ量は固定し、赤と橙ルシフェラーゼ量を変えた混合液における発光活性を、前述のロングパスフィルターが装備されているルミノメーター (ATTO社製) により測定した。その結果、図3-3に示すようにルシフェラーゼ量に応じた発光活性を算出できることが確認され、3つのルシフェラーゼ活性を1チューブ内で同時に測定可能であることが明らかとなった¹⁵⁾。

続いて実際にプロモーターを用いたレポーターアッセイでの検証を行った。核内オーファン受容体 RevErb/ROR α 4が、概日時計遺伝子 *Bmal1* の転写開始点近傍のROR応答配列 (RORE) を介して、その転写を活性化することは良く知られている^{1,11,16)}。この転写活性化の機構を詳細に解析するため、ROR α 4によるROREとコアプロモーターの活性化を直接比較した (図4-4)。SV40プロモーター上流に挿入したROREは赤ルシフェラーゼで、*Bmal1* コアプロモーターは橙ルシフェラーゼでモニターし、それぞれの活性は内部コントロールレポーターの緑ルシフェラーゼより補正した。その結果、ROR α 4はRORE、*Bmal1* プロモーターの両方の転写を濃度依存的に活性化したが、ROR α による*Bmal1* プロモーターの活性化はROREのそれよりも有意に高いことが明らかとなった。この結果、*Bmal1* コアプロモーター内には転写開始点近傍のRORE以外にもROR α に直接あるいは間接的に応答するシス配列が存在する可能性が示唆された。

このように、マルチカラーアッセイ系は、2つないし3つの転写の変動を直接比較できることから、これまで個別に測定・比較していた実験結果をより高い精度で、また簡便に得られるといえる。また、測定対象の組み合わせも任意であるので、例えばシグナル伝達系の上流と下流、時計遺伝子と細胞周期遺伝子など、細胞内で起こるダイナミックな転写のイベントを同時に解析することも興味深い利用方法の一つだろう。

5. リアルタイム測定系

概日リズムの研究では、ルシフェラーゼを用いた時計遺伝子発現のリアルタイム測定が日常的に行われている。他のライフサイエンスの分野ではまだ普及していない測定方法である。概日リズムの研究で広範に用いられている理由は、他の分野に比べて際立って長い測定を要することである。冒頭に述べたように、ルシフェラーゼの長所として、長時間の遺伝子発現モニタリングに適している点が挙げられる。

この特性を利用し、1993年近藤らはピプリオルシフェラーゼを用い、シアノバクテリアにおける画期的なリアルタイム測定系を開発した⁷⁾。現在使われているリアルタイム測定装置は、これがベースになっているといっても過言ではないだろう。その後ショウジョウバエ²⁾、シロイヌナズナ⁶⁾、さらに哺乳類の細胞、組織²⁸⁾でも測定がはじめられた。以前はレポーターベクターをゲノムに挿入したトランスジェニック体（あるいはそれから単離した組織・細胞）や安定細胞株が測定に用いられてきた。近年、上田らはレポーターベクターを一過的に株化繊維芽細胞に導入、リアルタイム測定することに成功し²¹⁾、遺伝子導入が可能な哺乳類細胞では、より簡便にリアルタイム測定が行えるようになった。

先駆的な実験では、ハンドメイドの装置が使われていたが、現在では浜松フォトンクス、ニューロサイエンス、ATTOなどのメーカーからリアルタイム測定用の装置が発売されている。本節では、哺乳類の株化培養細胞におけるリアルタイム測定の背景と幾つかの注意点、さらに我々のグループで最近開発したマルチカラーのリアルタイム測定方法について述べたい。

5-1. リアルタイム測定におけるルシフェラーゼとルシフェリン

一般にルシフェラーゼは他のレポーター酵素に比べ、細胞内での安定性は低いとされているが、いずれのレポーターにおいても転写の変動をリアルタイム

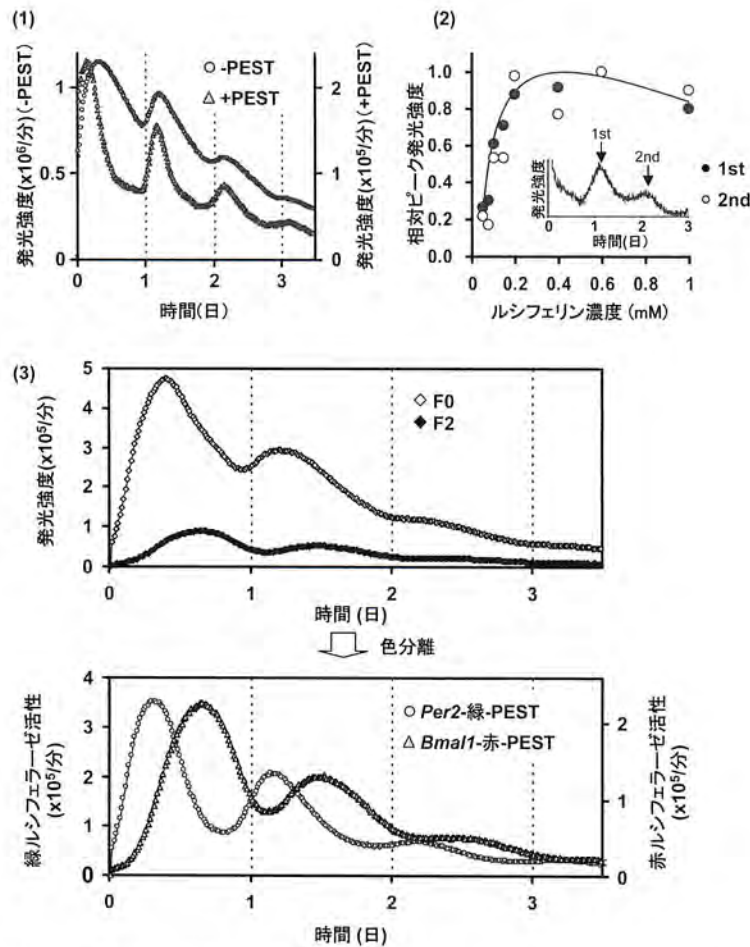


図4 株化培養細胞におけるリアルタイム測定

(1) リアルタイム測定におけるルシフェラーゼの安定性の影響。*mPer2* Ebox::TKプロモーターにPEST無し(○)またはPEST融合した(▲)ELucを連結したベクターをNIH3T3に一過的に導入し、リアルタイム測定した結果。(2) ルシフェリン濃度とピーク強度の相関性。*mPer1* Ebox-TK::Luc (+)ベクターを導入したRat1安定株を、種々のルシフェリン濃度において測定した際の1st(●)および2nd(○)ピークの発光強度を示す。インセット図はリアルタイム測定結果の一例を示す。(3) 緑および赤ルシフェラーゼを用いた*mPer2*および*mBmal1*プロモーターの同時リアルタイム測定。上図は*mPer2*-緑および*mBmal1*-赤ルシフェラーゼベクターをNIH3T3に一過的にコトランスフェクションし、光学フィルターの有(F2)無(F0)での測定結果を示す。下図はF0およびF2値から緑(○)および赤ルシフェラーゼ(▲)活性を計算した結果を示す。

ムで測定するには、細胞内でのある程度の不安定性が要求される。レポーター酵素の不安定化（短寿命化）には、以前よりオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）のPEST配列（タンパク質分解に関わるドメインにプロリン（P）、グルタミン酸（E）、セリン（S）、スレオニン（T）が多く存在する確率が高いことから、これらのアミノ酸を多く含むタンパク質分解ドメインの総称として呼ばれている）が用いられている⁸⁾。ルシフェラーゼを用いたリアルタイム測定においても、ルシフェラーゼのC末端にODCのPEST配列を融合させたキメラ体が使われることが多い。

図4-1は*mPer2*のE-boxに依存した発現を、クリックビートルルシフェラーゼ（ELuc）のC末端にPEST配列を融合した、あるいは融合させないもので測定した結果を示す。PEST配列と融合させることで、発光強度は20%程度に低下するものの、細胞内に残存するルシフェラーゼが少ないため、振幅の高いリズムが見られるようになる。我々の経験では、PESTを融合させたルシフェラーゼであっても、トランスフェクションするプラスミド量を上げると、周期に変化はないが、振幅の低下、見かけ上の位相後退がみられる。逆にプラスミド量を下げると振幅が増加し、見かけ上位相が前進する傾向がみられる。つまり同じルシフェラーゼを使いリアルタイム測定する場合でも、細胞内のルシフェラーゼ量により位相と振幅が変わる場合があるので、注意が必要である。

リズム研究に用いられる生物のうち、細菌を除きリアルタイム測定にはホタルルシフェラーゼが最も多く用いられている。発光基質であるホタルルシフェリンの高い細胞透過・浸透性と培養液中での安定性がその理由として挙げられる。ではどの程度のルシフェリンが適当であろうか？図4-2は*mPer1* E-boxのホタルルシフェラーゼベクターを導入したRat1安定株を、種々のルシフェリン濃度で測定した際の1stおよび2ndピークの発光強度を示す。各ピーク強度は、0.2 mMまで直線的に増加したが、それ以降プラトーに達し、1 mMでは低下した（細胞毒性によるものと考えられる）。実験系により異なるとは思いますが、細胞毒性の影響がなければ、プラトーな範囲でのルシフェリン濃度を用いた方が安定な結果が得られるだろう。我々は、培養液中でのルシフェリンの安定性について、高速液体クロマトグラフィーを用いて予備実験的に検討したところ、NIH 3T3細胞で5日間リアルタイム測定した後でも95%

のルシフェリンが残存していた（未発表データ）。このことから少なくとも数日間の測定においては、培養液中のルシフェリンの減少は実験結果に影響しないと考えてよいだろう。

5-2. 多色ルシフェラーゼを用いたリアルタイム測定

最近我々は、前述のマルチカラーアッセイをリアルタイム測定に応用することができたので紹介する。用いたルシフェラーゼは、前章で述べたイリオモテボタル緑ルシフェラーゼ（SLG）と鉄道虫赤ルシフェラーゼ（SLR）である。図4-3の上図は、*mPer2* プロモーターに緑ルシフェラーゼ、*mBmal1* プロモーターに赤ルシフェラーゼ（いずれもC末端にPESTを融合）を連結したレポーターベクターをNIH 3T3細胞に一過的に導入し、色分離用光学フィルターが装備されているATTO社製リアルタイム測定装置（クロノス）で測定した結果を示す。なお、PEST配列を融合した各ルシフェラーゼのNIH3T3細胞での半減期は約1時間であり、両者が同じ安定性であることは確認している。赤と緑の場合、図3-2で示したF0とF2を測定することで2色の分離・定量が可能である。図中のF0はフィルター無しで測定した全光、F2はR60フィルターを通した発光値である。なおクロノスでは、各ルシフェラーゼのフィルターに対する透過係数（予め決定しておく必要がある）を測定ソフトにセットしておけば、次式の分離色の計算をしながら各色の発光値をリアルタイムで表示してくれる。

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.0 & 1.0 \\ \kappa G_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ R \end{pmatrix}$$

κG_{R60} , κR_{R60} はR60フィルターに対する緑、赤ルシフェラーゼの透過係数、G、Rは緑および赤ルシフェラーゼ活性を示す。

図4-3の下図は、上図での値から緑および赤ルシフェラーゼの活性を計算し、プロットしたものである。内因性のmRNAの変動と同様に、緑と赤ルシフェラーゼでモニターした*Per2*と*Bmal1*プロモーターのリズム変動は逆位相を示した。この結果は、単色で測定した場合の位相、振幅、周期と一致すること、さらに緑と赤のルシフェラーゼを入れ換えて同時測定しても同じ結果が得られることから、正しく色分離がされていることを確認している。なお、定量性のレンジについては、十分な発光強度がある場合、緑と赤ルシフェラーゼの活性が100倍異なっ

ていても、正確に定量できることを確認している。

マルチカラーのリアルタイム測定では、2種のプロモーターを同時に測定可能なことが最大のメリットである。ホタルルシフェラーゼを単独で使用する場合、トランジェントアッセイで用いられている内部コントロールによる補正ができないため、位相や振幅の解析はできても転写レベルの増減を定量的に評価することはできない。増減を測定する場合、我々はSV40プロモーターに繋いだ緑もしくは赤ルシフェラーゼを内部コントロールとして用いることで良好な結果を得ている。また概日発現振動におよぼすシス配列の影響を解析する場合、野生型と変異体を同時に測定する事で、1時間の位相の変化を明瞭にモニターできている。さらに、同一プロモーターで発現する緑と赤の2種の細胞を作製し、共培養により細胞(群)間での同調や相互作用の有無を検証する方法についても構築している。このように、2種のルシフェラーゼの発光を同時に測定することで、1種のルシフェラーゼでは不可能であった実験系がデザインできるようになった。

6. シングルセルイメージング系

前節で述べたリアルタイム測定は、組織あるいはディッシュ内の全ての発光を検出してマスのデータを解析するのに対し、シングルセルイメージングは個々の細胞から発する発光をCCDカメラでイメージングすることで、個々の細胞の遺伝子発現の変動を経時的に定量することができる。また組織においては、これまで*in situ* ハイブリダイゼーションなどにより行われてきた遺伝子発現の位置情報についてもリアルタイムに解析することができる。概日リズム研究では、時計遺伝子の発現を指標に細胞間での同調や、組織内の発現部位の定量的な解析などに用いられている。

これまでルシフェラーゼは、その発光が微弱であるため、細胞レベルでのイメージングは難しいといわれてきたが、ここ数年でシングルセルイメージングを用いたリズム解析に関する大変興味深い解析結果が報告されるようになった。2003年、山口らは*mPer1*-Lucマウスの視交叉上核切片でのシングルセルイメージングに成功し、個々の細胞が異なる位相関係を保ちながら同調して振動することを発見した²⁷⁾。2004年には、Welsh²⁵⁾、名越¹⁰⁾(この論文では蛍光イメージングを使っている)らが、血清刺激により開始される株化培養細胞のリズムが、誘導ではなく同調であることを明らかにした。Carrらはゼブラ

フィッシュの胚性繊維芽細胞の個々のリズムが光により同調することを捕らえた³⁾。また驚くべきことに、Mihalcescuらはシアノバクテリアでのシングルセルイメージングについて成功している⁹⁾。

さて、ルシフェラーゼを用いたセルイメージング測定での成功の鍵は、イメージング装置の感度にも依存するが、いかに明るい試料を用意できるかであろう。イメージングでは個々の細胞の発光を捕らえるために対物レンズが用いられるが、一般的に検出効率率は、レンズ倍率を上げると倍率の2乗に反比例して下がるとされている(レンズを2倍から10倍に上げると感度は1/25になる)。装置については、ここ半年間でアトーとオリンパスの2社から、光学系が工夫され、比較的発光強度の低い試料でもイメージングが可能な装置が製品化された。シングルセルレベルでの発光イメージングの歴史は浅く、発展途上の測定系であるため、測定系の改良の余地が多く残っている。装置の改良についてはメーカーの方々に期待したいが、ここではイメージングに用いるルシフェラーゼについて触れてみたい。

これまでのシングルセルイメージングの報告では、いずれもホタルルシフェラーゼがレポーターとして用いられているが、果たしてホタルルシフェラーゼはイメージングに最適であろうか?ホタルルシフェラーゼの最適pHは約8であり、この条件では黄緑色に発光しているが、酸性側では赤色にシフトし¹⁸⁾、発光量子収率は1/2以下に低下する¹⁷⁾。また最適温度は約25°Cであり、通常細胞を培養している37°Cでは活性は1/3に下がる¹⁷⁾。先にも述べたように、ホタルルシフェラーゼは哺乳類細胞では赤く発光している。この原因がpHであるのか温度であるのかは定かではないが、いずれにしてもホタルルシフェラーゼの細胞内での環境は最適でないことは確実であり、発光のイメージングをする条件においては、ホタルルシフェラーゼの持つポテンシャルは著しく低下していると我々は考えている。

我々は発光イメージングに特化したルシフェラーゼを構築するため、発光スペクトルがpHの影響を受けないブラジル産クリックビートルルシフェラーゼ²³⁾のcDNAを改良し、野生型よりも200倍発現量を上げることに成功した(ELuc)。実際にNIH3T3に発現させイメージングに供したところ、同じ条件で発現させたホタルルシフェラーゼ(Luc(+))よりも10倍以上高い発光強度を示すことが明らかとなった(未発表データ)。図5-1にはその発光像の1例を示す。我々はもう一歩進んでオルガネラレベルで

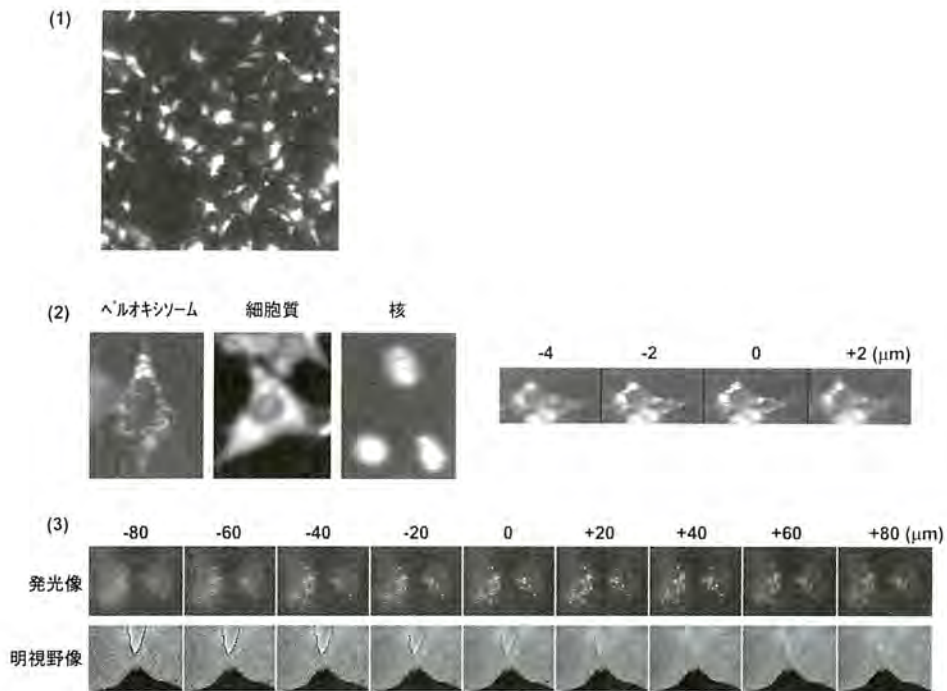


図5 1細胞レベルでの発光イメージング

(1) *mCry1::ELuc*ベクターをNIH3T3細胞に一過的に導入した際の発光イメージング(5.6倍対物レンズ、5分露光)。(2) ベルオキシソーム、細胞質および核に局在化させたELucのNIH3T3細胞における1細胞イメージング(40倍対物レンズ、3分露光)。右図はベルオキシソームに局在化させたELucの発光をZ軸方向にふって撮影した発光像を示す。(3) *mBmal1::ELuc*を導入したトランスジェニックマウスから単離した視交叉上核切片での発光イメージング(5.6倍対物レンズ、3分露光)。上段は発光像、下段は明視野像を示し、数字はZ軸方向の試料ステージの移動距離を示す。

のイメージングが可能かどうかを検討した。ホタルをはじめとする甲虫ルシフェラーゼは、いずれもC末端にベルオキシソーム移行シグナルであるSer-Lys-Leu (SKL配列)を有しており、実際、免疫染色によりホタルルシフェラーゼがベルオキシソームに局在していることが確認されている⁴⁾。ELucも同様にSKL配列を有し、免疫染色およびSKLが付加されたベルオキシソーム局在型GFPのイメージングにより、ELucがベルオキシソームに局在することを確認している。そこで、CMVプロモーターでNIH3T3細胞に発現させ、40倍の対物レンズを用いて発光イメージングに供したところ、図5-2に示すようにベルオキシソームに局在している様子が観察できた。参考までに、SKLを除き細胞質に局在化またはSV40の核移行シグナルを付加させ核に局在化させたELucのイメージング像についても図5-2に示した。プロメガから販売されているホタルルシフェラーゼLuc(+), Luc2はC末端のSKL配列が除かれているため、新たにSKLを付加してイメージングに供してみたが、我々の測定条件では全体にぼやけた発光像になってしまい、ベルオキシソームへ

の局在は観察されなかった。このように、強く光るルシフェラーゼを用いることで、時間・空間分解能が上がり、これまで見えなかったイメージング像が撮影できるようになると期待している。

最後に、綺麗な発光イメージング像を撮るためのテクニカルな点について述べたい。最も大事な点は、フォーカスをいかにあわせるかである。ATTO社製の装置は、電動の試料ステージコントローラーによりZ軸が1 μm単位で調製できるので、NIH3T3のベルオキシソームに局在化させたELucのイメージングをZ軸方向に2 μmずつふって測定した。その結果、図5-2に示すように(図中フォーカスのあった点を0とした)、40倍の対物レンズでは2 μmずれるとフォーカスがあわなくなり、全体にぼやけた像になることが判明した。株化細胞の厚みはおおよそ10 μm程度であるので、フォーカスは比較的あわせ易いが、組織の切片では最低でも100 μmの厚みがあるため、フォーカス調整は非常に難しい。図5-3は視交叉上核の切片を5.6倍の対物レンズを用い、Z軸方向に20 μmずつふってイメージングした発光像(上)と明視野像(下)である。低倍率

のレンズを用いているので40~60 μ m程度の許容範囲があることが分かったが、実際には下図のような明視野像を見ながらZ軸を決定するため、どこで発光のフォーカスがあうかは、ほとんど勘に頼ることになる。良い解決策はまだないが、蛍光色素や蛍光タンパク質などを使い、蛍光でフォーカスをあわせるのも一つの手段かもしれない。

7. おわりに

本稿ではホタルをはじめとする甲虫系のルシフェラーゼを用いた測定方法を中心に解説したが、この他に分泌型ルシフェラーゼによる遺伝子発現モニターも行われているので、興味のある方は参照して頂きたい^{13, 20, 26)}。ルシフェラーゼを発光プローブとする細胞機能解析については、発光と蛍光を組合わせたBioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) によるタンパク質-タンパク質相互作用解析^{15, 29)}、ルシフェラーゼを半分に切断し、再構成に伴う発光を測定することで細胞内タンパク質の相互作用や局在解析⁵⁾ など新たな技術が次々と開発されており、リズム研究にこれらを用いることで新たなメカニズムの解明に役立つのではないだろうか。

ルシフェラーゼアッセイ系をご存知の方には退屈な点もあったかもしれないが、これからルシフェラーゼを使い始める方々の一助になれば幸いである。

謝辞

共同研究者であるサンパウロ州立大学のVadim Viviani博士、北海道大学の本間研一先生、本間さと先生に感謝する。また、発光測定に関しては東京大学の秋山英文博士、ATTOの久保田英博氏、浅川篤氏、榎本敏照氏、ルシフェラーゼの改良については東洋紡績の西井重明氏、浅井友美氏の協力のもとすすめた。この場を借りて感謝する。最後に執筆の機会を与えて頂いた岡山大学の富岡憲治先生に感謝する。

引用文献

- 1) Akashi M, Takumi T: Nat Struct Mol Biol 12:441-448(2005)
- 2) Brandes C, Plautz JD, Stanewsky R, Jamison CF, Straume M, Wood KV, Kay SA, Hall JC: Neuron 16:687-689(1996)
- 3) Carr AJF, Whitmore D : Nature Cell Biol 7: 319-321(2005)
- 4) Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J,

- Subramani S: J Cell Biol 108:1657-1664(1989)
- 5) Kim SB, Ozawa T, Watanabe S, Umezawa Y: Proc Natl Acad Sci USA 101:11542-11547(2004)
- 6) Kolar C, Fejes E, Adam E, Schafer E, Kay SA, Nagy F: Plant J 13:563-569(1998)
- 7) Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Goldedn SS, Johnson CH: Proc Natl Acad Sci USA 90:5672-5676(1993)
- 8) Leclerc GM, Boockfor FR, Faught WJ, Frawley LS: BioTechniques 29:590-601(2000)
- 9) Mihalcescu I, Hsing, W, Leibler S: Nature 430:81-85(2004)
- 10) Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U: Cell 119:693-705(2004)
- 11) Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, Honma K : FEBS Lett 565:122-126(2004)
- 12) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, Ohmiya Y: BioTechniques 38:891-894(2005)
- 13) Nishide SY, Honma S, Nakajima Y, Ikeda M, Baba K, Ohmiya Y, Honma K: Genes Cells 11:1173-1182(2006)
- 14) Ohmiya Y, Sumiya M, Viviani VR, Ohba N: Yokosuka City Mus 47:31-38(2000)
- 15) Pflieger KD, Eidne KA: Nat Methods 3:165-174(2006)
- 16) Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB: Neuron 43:527-537(2004)
- 17) Seliger HH, McElroy WD: Arch Biochem Biophys 88:136-141(1960)
- 18) Seliger HH, McElroy WD: Proc Natl Acad Sci USA 52:75-81(1964)
- 19) Shimomura O: Bioluminescence, Chemical Principle and Methods 1-454: World Scientific(2006)
- 20) Tanahashi Y, Ohmiya Y, Honma S, Katsuno Y, Ohta H, Nakamura H, Honma K: Anal Biochem 289:260-266(2001)
- 21) Ueda H, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S: Nature 418:534-539(2002)
- 22) Viviani VR, Bechara EJ, Ohmiya Y:

- Biochemistry 38:8271-8279 (1999)
- 23) Viviani VR, Silva AC, Perez GL, Santelli RV, Bechara EJ, Reinach FC: Photochem Photobiol 70:254-260 (1999)
- 24) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, Ohmiya Y: Biochem Biophys Res Commun 280:1286-1291 (2001)
- 25) Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA: Curr Biol 14:2289-2295 (2004)
- 26) Yamagishi K, Enomoto T, Ohmiya Y: Anal Biochem 354:15-21 (2006)
- 27) Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H : Science 302:1408-1412 (2003)
- 28) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H: Science 288:682-685 (2000)
- 29) Xu Y, Piston DW, Johnson CH: Proc Natl Acad Sci USA 96:151-156 (1999)

第13回日本時間生物学会学術大会と 第22回国際生物学賞記念シンポジウムを終えて

深田吉孝・広田 毅

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

第13回日本時間生物学会の東京学術大会は、2006年11月30日から同12月2日までの3日間、東京国際フォーラムにおいて開催されました。すでに前号の巻頭言でご紹介したように、昨年、第22回国際生物学賞の授賞分野に『Chronobiology』が選定され、オランダ・ Groningen大学のSerge Daan博士が受賞者に決定しました。これを記念する国際生物学賞記念シンポジウムが、本学術大会に日程を一部重ねて同じく東京国際フォーラムで開催されました（開催責任者：深田吉孝）。このような事情から本稿では、国際生物学賞記念シンポジウムの報告も併せ、本学会の第13回学術大会について報告させていただきます。



写真1 深田大会長からの開会の挨拶 (ホールD5)

まず第13回学術大会の開催準備のため、東大の学会員を中心に、海老澤尚（以下敬称略：東大／院医）、前村浩二（同）、岡野俊行（早大／理工）、小島大輔（東大／院理）、真田佳門（同）に筆者両名が加わって大会準備委員会を作り、準備委員会事務局を広田毅が務めました。会場は当初、東大キャンパスの中で山上会館と理学部が新築した小柴ホールの2会場を予約していましたが、急遽、併催することになった国際生物学賞記念シンポジウムに日程の制限などがあり、頭書の日程と会場に決まりました。大学施設を利用する場合に比べて会場費が大幅に上がったため、財源をいかに確保するかが準備委員会での大きな課

題となりました。このような切迫した状況のなかで各委員が熱心に企業各社に働きかけ、本間研一理事長をはじめ一部の学会理事のご協力もいただいて、大会の開催2ヶ月前にようやく一息つける状況にこぎつけました。準備委員の皆様と学会理事各位に心から感謝申し上げる次第です。

学術セッションの編成では、準備委員に加えて大塚邦明教授と柴田重信教授にプログラム委員として議論に参加していただき、臨床と基礎の両分野あわせて5つのテーマを選定しました。各シンポジウムの報告は別に記事があるようですので、テーマを記すだけにとどめます。『フィールド医学と時間医学』



写真2 学会懇親会にて (東京国際フォーラム ロイヤルキャフェテリア)

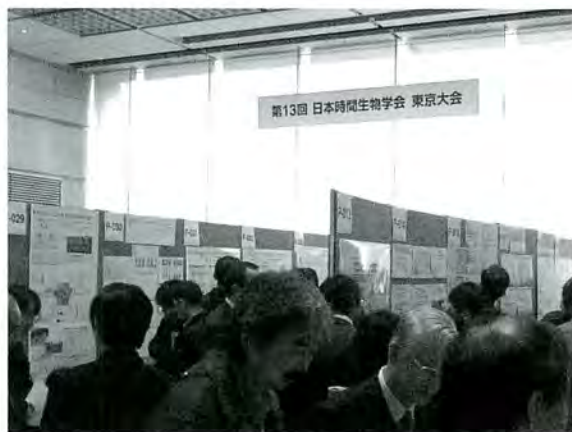


写真3 学会ポスター会場 (ホールD5)にて

『時間栄養学—食とリズム』『分子時計研究の最前線』『精神疾患とリズム』『メタボリックシンドロームとリズム』がタイトルですが、いずれのセッションにも多くの聴衆が集まり、高いレベルの講演に対して活発な意見交換が行なわれました。中でも、東京国際フォーラム・ホールD1は定員132席というコンパクトな会場で、聴衆にとっても近い位置に講演者が立つので会場に一体感があり、いっそう熱のこもった議論が行なわれました。当初、ホールD1では聴衆を収容しきれない可能性を危惧しましたが、そのような事態も起こらず、広い会場よりもむしろ、このようなコンパクトタイプの会場が本学会の学術講演には似合っている印象を持ちましたが、皆様はどう感じられたでしょうか。

さて、会員による一般発表こそが学術大会の中核であることは言を俟たない事ですが、大会には100演題の申し込みがありました。今回は、上述のシンポジウム(27演題)と国際シンポジウム(31演題)に数多くの講演が組み込まれましたので、これに加えて100題ものポスター発表が集まったことは喜ばしい限りです。ポスターによる一般発表の重要性を鑑みて、ポスター会場には多くの参加者が流れ込む



写真4 国際生物学賞授賞式にて(2006年11月20日)
(photo by Anna Wirz)



写真5 記念シンポジウム晩餐会にて天皇陛下からの下賜記念メダルを披露するダーン博士(photo by Anna Wirz)

よう、いろいろな方策を練りました。各企業による機器展示をポスター会場内で行ない、共存共栄を図りました。また、国際シンポジウムのセッション間の時間を長く設定してポスター発表の指定討論時間とし、両会場の動線にも工夫しましたが、いかがだったでしょうか。ポスター発表の中から一部の演題をシンポジウム『分子時計研究の最前線』のショートトークに汲み上げ、ごく一部ではありますが若い学生会員にも口頭発表の機会を与えることができました。残念ながら、時間的な制約から他のシンポジウムセッションでは講演への汲み上げができなかったため、ご希望に添えなかった事もあるかと思いますが、この点はどうかお許しください。

会期の3日間ともランチョンセミナーを行ない、参加者の皆様が一日を通して会場で過ごせるようにして、インターネットの専用スペースも確保しました。ホール使用料が高いため、参加者が自由に過ごせる広い休憩スペースが確保できませんでしたが、東京の都心という地の利を生かして、議論や懇親には会場近くの店舗を利用していただけたのではないかと考えております。

一方、国際生物学賞記念シンポジウムの参加者は、外国人約20名を含めて240名近くにのぼり、会場の東京国際フォーラム・ホールD7には常に満員に近い多くの聴衆が集まりました。日本学術振興会からの要請を受けて一般公開シンポジウム(参加費無料)としましたので、かなりの人数の一般参加者が入場しました。この事実は、本学会の研究テーマである時間生物学が一般社会からも強く注目されている証しで、非常に喜ばしいことだといえます。さて、この記念シンポジウムは、本学会学術大会期間の2日目と3日目に併催され、セッション1:ヒトの時間生物学、セッション2:脊椎動物の時間生物学I、セッション3:脊椎動物の時間生物学II、セッション



写真6 学会とシンポジウム終了後の打ち上げ(東京国際フォーラムガラス棟からの夜景を楽しみながら)(photo by Anna Wirz)

ン4：ショウジョウバエの時間生物学、セッション5：植物、シアノバクテリア、アカパンカビの時間生物学、に分けて招待講演が行なわれました。多様な生物のリズム現象とその根底に潜む分子メカニズムを研究している国内外の第一線の研究者が招聘され、生物リズムに関する最新の知見と諸問題が総合的に議論されました。紙面の都合で各講演の内容にはふれませんが、シンポジウムの最後に、第22回国際生物学賞を受賞したSerge Daan博士が「夜明けと夕暮れ：2つの因子による概日時計の同調」という演題で記念講演を行ないました。この講演でDaan博士は、オランダと日本の交流の歴史から紹介し、その後、同博士がこれまで時間生物学の分野で展開した研究史の集大成を述べられました。このように本シンポジウムにおいては、時間生物学の研究分野の最前線の研究成果が発表され、今後の研究に向けた議論と問題提起を通じて、時間生物学分野における国際生物学賞受賞者の業績とそのインパクトが浮き彫りになり、本賞の学術的意義が国際的に高めら

れたと言えます。

最後に、本学術大会の開催にあたっては、ランチョンセミナー担当のアトー(株)とオリンパス(株)をはじめ、ブース展示には9社、寄付と広告掲載は21社からの協力をいただきました。このようなご協力のもとで、国際生物学賞記念シンポジウムを併催する事により、時間生物学の学問的アピールを行うと共に、大学院生をはじめとする幅広い若手研究者への啓蒙をも行うことができたと考えています。本学術大会には、一般参加者241名(うち当日参加登録者は82名)、学生参加者102名(うち当日参加登録者は21名)、これらの合計は343名にのぼり、例年の大会よりもかなり多い参加者を迎えることができました。特に、例年にもまして数多くの学生参加者を迎えることができたのは主催者にとって大きな喜びであり、日本学術振興会をはじめ、ご協力いただきました関係各位にここに心よりお礼を申し上げる次第であります。

「第13回日本時間生物学会学術大会」と 「第22回国際生物学賞記念シンポジウム」参加記

浜坂康貴

(独)産業技術総合研究所生物機能工学研究部門 生物時計研究グループ特別研究員

2006年11月30日から12月2日まで第13回日本時間生物学会学術大会に参加した。今学会は、第22回国際生物学賞の授賞分野として『時間生物学(Chronobiology)』が選定されたため、受賞者を招いて開催される記念シンポジウムと同時に開催された。恥ずかしながら、私は国際生物学賞を知らなかったもので、学会に参加する前にネットで公式ページを閲覧してみた。それによると、設立の趣旨は“昭和天皇の御在位60年と長年にわたる生物学の御研究を記念するとともに生物学の奨励を図る”ことなのだそう。受賞者は“生物学の研究において世界的に優れた業績を挙げ、世界の学術の進歩に大きな貢献をした研究者”を対象分野から“原則として毎年1人”が選ばれる。受賞分野の選定は国際生物学賞委員会が行い、受賞者の決定は“内外の関係学術機関・団体及び有識者からの推薦に基づき”最終的には国際生物学賞委員会決定するそう。ちな

みに、第16回、「発生生物学」分野での受賞者は、ショウジョウバエを使って初めて概日リズムの変異体を単離したことで有名なDr. S. Benzerなのだそう。そして、今回の第22回国際生物学賞『時間生物学(Chronobiology)』分野での受賞者は、Dr. Serge Daan(オランダ、グローニンゲン大学教授)だった。

ハエの概日リズムを主に勉強してきた私にとって、哺乳類の研究が多いといわれる時間生物学会は初めての参加だった。今回は国際生物学賞記念シンポジウムと同時開催ということで、“論文などで名前は知っているけど、顔を知らない”国内外の著名な研究者(受賞者のDr. Daanを含む)を拝見できる機会としてとても楽しみにしていた。

初日の11月30日は日本時間生物学会会員による年次発表会だった。開催場所は、東京国際フォーラムで、ここはアイドル歌手などがコンサートをする設



写真1. 講演会場（5階総合受付）傍のテラス。講演の合間には、コーヒーを飲みながら休憩している人であふれた。ちなみに講演会場は7階のホールだった。

備があるほど有名かつ巨大な施設らしい。関東に不慣れな私でも、この“周辺駅からは徒歩で5分”の建物には、迷うことなく着けるだろうと高をくくっていた。しかし、当日の朝、地下鉄の駅から地上へ出てみると、外は巨大なビルに囲まれて、どの方向に歩けば会場にたどり着けるのか見当がつかない。さらに困ったのは東京国際フォーラムにたどり着いてからで、施設があまりにも大きいためなかなか学会会場を見つけることが出来なかった。右往左往していると学会参加者の人ごみが見つかり、なんとか学会受付にたどりついた。

この日の午前中は「フィールド医学と時間医学」のセッションと「時間栄養学—食とリズム—」が行われた。さらに、午後の部では近年話題になっている“メタボリックシンドローム”と絡めて、摂食、肥満、糖尿病、血圧変動と体内時計の関わりについてのワークショップが設けられるなど、概日リズムの研究が日常生活に直結するような話題が数多く扱われた。また、午後の別会場では「分子時計研究の最前線」と題したワークショップが行われ、講演を聴きにきた人が会場からあふれ出るほどに賑わった。ここでは、PERとルシフェラーゼ（Luc）の融合タンパクを培養細胞に発現させることでPER分解のリ

ズムを追った研究や、哺乳類以外の脊椎動物から見つかった新規クリプトクロム（CRY4）の機能をニワトリにおいて解析した研究、Lucイメージングによってマウス視交叉上核の*Per1* 遺伝子の発現リズムについての研究など、シアノバクテリア、シロイヌナズナ、ゼブラフィッシュを含めた様々な種で、新規時計遺伝子の探索や新しいモデル構築への試みについて発表があった。

この日に、私の印象に残ったのは“ランチョンセミナー”である。私は学会の“ランチョンセミナー”にも初めての参加だったため、“ランチョンセミナー”のお弁当が用意されていたのには驚いた。さらにびっくりしたのは、お弁当の中身。とても豪華なのだ。あとで聞いた話によると、このお弁当は帝国ホテル製だったとか。午前中に、食生活や栄養バランスと日周期リズムの講演を聴いただけに、豪華なお弁当で私のお腹も体内時計も大満足だった。もちろん、“ランチョンセミナー”での収穫はお弁当だけではない。この日はルシフェラーゼ（Luc）によるレポーターアッセイを改良することによって、より複雑な解析が出来るようになったという講演が行われた。そのうちの 하나가、鉄道虫由来のLucとイリオモテホタル由来のLucを同時に検出する手法。この2つのLucは同じ基質を使うにもかかわらず、前者は赤色を、後者は緑色を発光するので2種類の遺伝子発現を同時に測定するのに便利なのだそう。もう一つは、Luc活性をイメージングで検出する手法。この手法を用いることで、組織あるいは培養細胞における遺伝子発現を細胞毎に経時的に検出することができるという。今学会ではLucイメージングによる研究が多数見受けられ、また、3日目のランチョンセミナーでもLucイメージング用の機器の宣伝があるなど、今後、リズム現象の強力な解析手法として普及しそうな印象を受けた。

次の日、12月1日は、国際生物学賞の記念フォーラムが前日と同じ場所で開かれた。この日、少し遅刻した私は、慌てて地下鉄の駅を出て東京国際フォーラムへ向かっていた。すると、私の少し前を背の高い3人の年輩の外国人が歩いている。彼らはキョロキョロと何かを探している様子だった。「もしかしたら、学会に参加する人達かな？」と思わないでもなかったが、ここは国際都市東京、外国人が観光で歩いても不思議ではない。急いでいたこともあり、私は彼らを横目に会場に向かった。しかし、その外国人達も目的地は同じのようで、彼らは地図を見ながら私と同じ方向に歩きだし、小走りの

私を長い足で悠々と歩いて追い越していく。私は彼らが乗り込んだエレベーターにしろ滑り込み、彼らと一緒にフォーラムの会場に乗り込んだのだった。「そっか、彼らは受賞記念講演に招待された人達だったのか。招待されてるって事は、かなり有名な人なんだろうな」と思い、私はフォーラムを聴きつつも、彼らが何者なのか見守ることにした。

フォーラムでは開会の挨拶が終わり、続いて第22回国際生物学賞の受賞者のDr. Serge Daanの経歴と先立って行われた授賞式の様子を紹介していた。Dr. Daanの代表的な業績の一つはげっ歯類での実験データをもとにした二重振動体モデルとnon-parametric同調モデルなのだそう。これらの研究は30年くらい前に発表されているにもかかわらず、前者は近年でもショウジョウバエの概日リズムの論文に引用されている。遺伝子解析や分子生物学的手法など最新の技術がどんどん出てくるなかで、研究分野にもよるのだろうが30年前の論文が引用されることは多くないのではなかろうか（実際、今、手近にあった論文をいくつか見たのだが、引用されている論文の8割以上が10年以内に発表されたもので、30年前の論文は一つもなかった）。おそらく、Dr. Daanの国際生物学賞の受賞は、彼の確かな研究と先見の明が多くの人に支持されている現われなのだろう。

そしてフォーラムはDr. Daanの経歴の紹介が終わり、いよいよ受賞者本人のお出ましという運びとなった。会場を埋め尽くした参加者は大きな拍手で、Dr. Daanの登場を促している。「Dr. Daanはいったいどんな姿をしているんだろう？」私は興味津々で、ほぼ満員となっている会場をグルグルと見回した。するとその時、私と一緒に会場に乗り込んだあの3人の外国人のうち、背の高い一人が立ち上がり、マイクを片手に挨拶をするではないか！ そう、彼こそがこのフォーラムの主役であるDr. Serge Daanで、私はこの時はじめて彼の容姿を知った。

さて、この日の午前中は“Chronobiology in Humans”、午後からは“Chronobiology in vertebrates I”と題したセッションが開かれた。午前中のセッションでは、人の生活パターンやリズムを調べているということもあって、分子生物学的な研究は少なく、むしろ臨床で集めた睡眠・覚醒のデータを“Two Process model”に照らし合わせた講演が多かった。午後のセッションでは一転して、マウスなどの体内時計を分子生物学的手法で調べた研究が多く、SCNから放出される神経ペプチドProkineticin2

の役割を調べたものや、mPER2の免疫沈降で共沈したタンパクをMS-TOFで同定し、新規時計調節因子を探した講演などが印象的だった。そんな中で少し驚かされたのはDr. Blockの講演。老齢マウスで明暗周期の位相をずらす（いわゆる時差ボケ）実験をしたところ、毎週6時間ずつ位相が前進する条件に曝したマウスは短命になったという。会場には海外から招待された研究者が多数見受けられたが、今回の訪日で彼らの健康に悪い影響がなかったか少し心配になった。

午後のセッションの前には、ポスターの発表の時間が設けられた。出ていたポスターは約100題で、どれも活発な議論で盛り上がっていた。ポスター発表会は時間生物学会のイベントなので日本語のポスターがほとんどだったが、中には国際生物学賞の記念シンポジウムのために招待された海外からの研究者を引っ張り込んで、英語で議論している場面も見受けられた。私は前日の“ランチョンセミナー”で聴いた赤Lucと緑Lucの手法を使った研究に注目した。そこでは赤と緑それぞれのLucを*Bmal1*プロモーターに連結し、それらをラットの培養細胞に導入したところ、得られた赤Lucの安定株の概日周期は、偶然にも緑Lucの安定株のそれよりも短かったという。では、これらの細胞株を混ぜて培養するとそれぞれの概日周期はどうなるでしょうか？という内容だった。Lucイメージングと共に、2色Luc法は異なる遺伝子の発現を経時的に追うなどの方法で今後の発展が大変期待される。

3日目の12月2日は、午前前半に“Chronobiology in Vertebrates II”、後半は“Chronobiology in Flies”、午後からは“Chronobiology in Plants, Fungi and Bacteria”が催された。朝型時計と夜型時計の講演を幾つか聴いていたが、“Chronobiology in Vertebrates II”でも、朝型と夜型の時計の話聞くことが出来た。それはDr. H. Uedaの研究室でのエピソードだった。彼の研究室では試薬を使って実験をする（wet）研究者と、その実験値をコンピューターで解析をする（dry）研究者がペアになって研究しているという。効率のいいことに、前者のwet研究者は昼に活発に実験を行い、後者のdry研究者はその実験値を夕方に受け取り、主に夜中に分析するのだそう。昼夜で異なる転写因子がリズムを調節しているという講演内容もさることながら、実験体制も昼夜シフトになっていることに感心してしまった。その他にも、mPER2タンパクのリン酸化や、*mPer1*の翻訳が3' UTRとmLark1によって調節

される機構についての発表があった。

“Chronobiology in Flies”では、Dr. M. Youngが欠席のため発表が取りやめとなった。彼は、今回のシンポジウムで私が注目していた研究者の一人だったので残念だった。一方で、ある女子学生は“Dr. M. Youngはハリウッド俳優のようにかっこいい”と噂を聞いていたらしく、私以上に残念そうだった。このセッションでは、キイロショウジョウバエには温度感受性の時計と光感受性の時計があり、前者は背側にある神経群、後者は脳側方部にある神経群であることや、*fmr1*を欠損したハエの羽化リズムは正常であるが活動リズムには異常が見られるなどが発表された。キイロショウジョウバエでの研究にもかかわらず、Dr. Daanを含む哺乳類の研究者らも盛んに質問するなど、現在の時間生物学では生物種に関係なく「異なる性質あるいは役割をもつ複数の時計」が中心的課題となっている印象を受けた。

個人的にはDr. P. Hardinの講演が、この日は最も印象に残っている。これまで、PDP1はVRIと同様にCLKの発現を調節していると考えられていたのだが、彼はPDP1タンパクの量を減少あるいは増加させても、*Clk*のmRNAレベルやPERやTIMタンパクの振動には影響を及ぼさないことを見出した。一方で、PDP1タンパクの量の減少あるいは増加が、活動リズムの消失を引き起こしたことから、PDP1はフィードバックループの一部というよりもむしろ時間情報を出力するために必須な転写因子であると考えられたという。今後、彼はPDP1がどのような遺伝子の発現を調節しているのか調べるそうである。時計遺伝子によるフィードバックループの研究は盛んに行われているが、そのループから出力へ向かう経路については、私の知る限り、ショウジョウバエではほとんど報告がないように思う。彼の研究の進展に注目したい。

“Chronobiology in Plants, Fungi and Bacteria”では、異なる生物界での転写翻訳のフィードバックによる時計について講演を聴いた。植物や赤パンカビの時計遺伝子は、哺乳類やハエなどのそれと相同性はないものの、遺伝子の転写とその産物による負のフィードバックで概日リズムを作ることには変わらない。一方で、近年示されたシアノバクテリアのKaiCによるリン酸化リズムは、転写が関与していない時計機構という点で異彩を放っていた。KaiCによるリン酸化リズムとその他の時計遺伝子の相互作用についての解析が進められているようで、今後、この独特のメカニズムが転写翻訳レベルでのリズム



写真2. 東京国際フォーラムのガラス棟の内部。記念フォーラムの後に、ここの7階で立食パーティーが催された。

や同調機構の面でどのような進展を見せるのか、多くの人が注目していることだろう。

そして、最後の発表は第22回国際生物学賞受賞者のDr. Daan。彼の講演はオランダが江戸時代に日本と出島で交易していたことを引用しつつ、日本とオランダの交流の歴史から始まった。彼はDr. AschoffとDr. Pittendrighの両者と研究をしたことがあり、そのなかから、non-parametric同調とparametric同調モデルを比較し、parametric同調モデルの実証に力を入れている。そこで、彼は東欧の森の中に大きな囲いを造り、その中にマウスを準自然条件で放し飼いにしながらその行動パターンと光の関係を1年近くにわたって調べた。そのスケールの大きさが、閉会後に催された立食パーティーでも研究者の間ではしばしば話題になっていた。

さて、今学会の印象は上記にも織り交ぜたが、2つの言葉、「複数の時計」と「ホタルの光」にまとめることが出来た。近年の詳細な解析や分子生物学的手法などによって、「複数の時計」の存在や性質が証されつつある印象を受けた。今後も「複数の時計」がどのようにそれぞれの周期や位相を同調させているのか、また、それらがどのように個体の概日リズムを調節しているのか、興味深いところである。「ホタルの光」は、もちろん、Lucイメージングや2色

Lucによるレポーター・アッセイのことなのだが、これらの手法は複数の時計の相互作用・同調を調べるうえで強力な解析手法となるのではないかと思う。この学会では、著名な研究者に会って話を聞いたこ

とや、様々な生物種での最先端の研究や技術を学ぶことができるなど、貴重な機会となった。今後も、時間生物学会に参加しようと思う。

シンポジウムS1 フィールド医学と時間医学

大塚邦明

東京女子医科大学

大阪医大の村上氏は、フィールド医学調査における75歳以上の高齢者を中心に、認知機能、ADL機能ならびに抑うつが、心拍変動LF成分と相関すること、また5年間の追跡調査で、60秒の時間予測(time estimation)が75秒以上と延長している群で生命予後が悪いことを抽出し、その背景にはADL機能の低下と抑うつ傾向があることを見いだした。地域高齢住民の健康管理の新しい指標として注目される。東京女子医大の山中氏は、40~74歳の地域住民の追跡調査から、7日間血圧変動様式を観察し、仮面高血圧の1つであるmasked non-dipperが不眠と関係していることを見だし、5年間の追跡調査で、動脈硬化進展の予防に、適切な睡眠時間と睡眠の質の改善が有効であることを示した。日本歯科大学内科の河村氏は、中国新疆ウイグル自治区のカザフ族の血圧変動を調査し、81%の住民がnon-dipper型を呈し、circadian rhythmが消失していること、その背景には、遊牧民であり、野菜・果実からのK摂取

が少ないことがその原因の1つであると論じた。座長として東京女子医大の大塚は、地域住民の5年間の追跡調査から、心拍のcircadian rhythmが消失している住民に発癌の頻度が高いことを示した。

生命活動は多重の時間構造(その各々の時間単位、クロノム)から成り立っている。重畳するクロノムを数理的に解析し、生命と環境との相互作用の力学を解読して行く学問体系を、座長らはクロノミクスと称している。一方、医師として、ヒトの生老病死を見極めるには、直接、地域に出て行き、生活するあるがままのヒトと医学的な対応をしつつ、各々異なる生活習慣・社会的背景・自然環境等が、疾病に及ぼす影響を、もう一度とらえ直していくという、文化人類学的視点が重要である。すなわち、クロノミクスを基本に調査結果を解析し、その解読結果を基に、医学的に介入して行くことが大切である。その意味で、このシンポジウムの意義は大きい。

シンポジウムS2 「精神疾患とリズム」総括

海老澤 尚

東京大学大学院医学系研究科睡眠障害解析学

精神疾患、特にうつ病、躁うつ病などの気分障害は体内時計異常との関係が疑われ、歴史的に数多くの研究が行われてきた。しかし、未だ決定的な因果関係が証明されるにはいたっていない。近年の研究

の進展により、改めて気分障害の病態生理に時間生物学の手法を使って切り込んでいくことが可能となってきたため、本シンポジウムを企画した。シンポジウム会場は多くの熱心な参加者で埋められた。

最初に東京大学大学院医学系研究科の海老澤は、精神疾患とリズムについて今まで報告された知見をレビューした。大うつ病性障害では概日リズムの位相の前進を反映していると考えられる症状が見られ、季節性感情障害では日照時間や概日リズム異常と疾患との関係、光療法の有効性などが報告されている。また、家族性睡眠相前進症候群では高率に気分障害を併発することが知られ、時計遺伝子多型と気分障害との相関を示す報告も見られる。気分障害の治療法の中に体内時計に働きかけると考えられるものがあること、気分安定薬であるリチウムがGSK-3 β の阻害を介して体内時計を変化させている可能性などを説明し、気分障害の発症に体内時計が関わっていることを示す所見が数多く得られていることを紹介した。

東北大学病院周産母子センターの太田氏は、「恒明環境が発達早期の生物時計に与える影響」について話した。早産児では網膜のかん体細胞・錐体細胞・節細胞のうち、メラノプシンを含む節細胞の働きがメインなので周囲の環境の明暗はわかるが、物の形や色はわからず、眼からの光刺激は主に体内時計のある視交叉上核に伝わる。また、早産児では昼・夜の区別がある明暗環境においたほうが、24時間明るい恒明環境や、24時間暗い恒暗環境においたよりも体重増加が早く、新生児集中治療室の主流である恒明環境はベストではない。mPer1-GFPトランスジェニック・マウスを使った研究から恒明環境で育てた場合、体内時計が乱れるが、それは明暗環境に移すことで修復可能であることも提示し、今後のあるべき早産児の治療環境について提案を行った。

国立精神神経センター精神保健研究所の三島氏は、「冬季うつ病は“特殊な”うつ病か？」と題して講演を行った。冬季うつ病では過食、過眠などの症状が高頻度で見られ、非季節性うつ病では食欲不振、不眠が多いことと対照的である。冬季うつ病の病因として、病相が冬季に繰り返すことから、日照時間の関与が疑われている。米国などの研究では、緯度が高いほど冬季うつ病の頻度が高く、この病因論を支持している。冬季うつ病では非季節性うつ病にはあまり見られない症状として炭水化物飢餓があるが、食事に炭水化物を多く摂取するとインシュリン分泌を介して血漿中トリプトファン（セロトニンの前駆体）濃度が増加し、これが抗うつ作用を示すのではないかと考えられる。冬季うつ病ではトリプトファン欠乏食で症状が再燃することが多いこともこの説と合致する。また、セロトニン作動薬は光照射

療法と同程度の抗うつ効果が見られる。冬季うつ病での概日リズム異常の存在については再現性が低く、セロトニン作動薬の効果やセロトニン枯渇による症状の再燃率は大うつ病と同等である。他のモノアミン作動性薬の効果も同等に有効で、光療法も双方に効果的である。これらのことから、冬季うつ病の病態が非季節性気分障害と異なるのか、患者の均一性が保たれているかなどが問題と指摘した。

早稲田大学の工藤氏は、「気分障害治療薬と体内時計遺伝子の役割」について話した。気分障害の治療薬として日本ではリチウム、カルバマゼピン、バルプロ酸がよく用いられているが、それぞれの薬が時計遺伝子を介して治療効果を持つ可能性を探った。細胞レベルでの研究では、気分障害治療薬はあまり効果を示さなかった。組織レベルでは、リチウムとカルバマゼピンによってコントロールマウスの概日リズム周期が伸びた。個体レベルでは、双極性障害患者では脳内モノアミン量が減少しているという知見を元に、セロトニン神経を破壊する5,7-dihydroxytryptamine (DHT) を側脳質に投与して気分障害のモデルマウスを作成し、気分障害薬の効果を検討した。DHT投与によりマウスの行動量は増加し、それはカルバマゼピン投与により抑えられたが、リチウムやバルプロ酸は特に行動量を変化させなかった。また、DHTマウスにカルバマゼピンやバルプロ酸を投与すると強制水泳での不動時間が延長した。DHTマウスでは前頭葉のPer1遺伝子発現量が増加していたが、これはカルバマゼピン投与により抑えられた。コントロールマウスでは、カルバマゼピン投与後も有意な行動量の変化は生じなかった。また、コントロールマウスでは強制水泳実験で、気分安定薬は不動時間に影響を与えなかった。時計遺伝子発現量にも変化を生じなかった。したがって、カルバマゼピン投与がPer1遺伝子発現量の変化を介して気分障害に効果を及ぼしている可能性が示された。

理化学研究所の笠原氏、加藤氏は「双極性障害モデルマウスにおける時間生物学的検討」を話した。前半は加藤氏がうつ病や双極性障害の臨床症状についての特徴を説明し、気分安定薬には神経保護作用があり、³¹P-MRIを用いた研究では細胞内pHの低下、うつ状態で高エネルギーリン酸（クレアチンリン酸）が低下するなど、ミトコンドリアDNAの異常によるミトコンドリア病CPEO（慢性進行性外眼筋麻痺）と類似点があることを示した。CPEO患者では気分障害の併発例が多いことから、脳だけにミトコンド

リア遺伝子異常を生じるマウスを作成し、躁うつ病モデルマウスを開発した。後半では笠原氏が、校正機能を失わせたミトコンドリアDNA合成酵素が神経特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作製したところ、Tgは野生型 (WT) に比べて平均行動量が少なかったと話した。また、マウスの休息期である明期の始まりおよび終わりにも活動が生じており、ヒトの睡眠障害に相当するのではないかと考えられた。抗うつ薬を投与すると行動量が増加し、これは双極性患者に抗うつ薬を投与した

場合の躁転に対応するのではないかと考えられた。また、メスの場合には行動量が性周期に関連して周期的に増減し、その活動量の増減は気分安定薬であるリチウムで改善した。したがってTgは初の双極性障害モデルマウスと考えられると話を締めくくった。

以上、少しずつではあるが、気分障害と体内時計とのかかわりがさまざまなアプローチから示されていることが示された。今後この分野でますます多くの研究が行われるであろうと確信した。

ワークショップW2「分子時計研究の最前線」総括記事

広田 毅

東京大学大学院理学系研究科

本ワークショップは大会初日 (11月30日) の午後12時から2コマ通して開催されました。シアノバクテリアからマウスまで、体節形成から概日リズムや光周性まで、時間生物学の研究を幅広く網羅し、リズム現象の分子機構に対する理解を深めることができると考え、企画させて頂きました。発表は8題の講演の他に、一般演題からのショートトークを5名の方にお申し込みしました。会場は東京国際フォーラムのホールD1で、132の客席がお蔭様でほぼ満席となりました。会場の狭さゆえ、お座りになれなかった方にはお詫び申し上げます。休憩を挟んで4時間15分の長丁場でしたが、個人的には色々学ぶことができ、実りある時間を過ごさせて頂きました。以下に簡単ではありますが、講演内容を紹介させて頂きます。

まずはじめに、今年度の日本時間生物学会学術奨励賞を受賞された八木田和弘先生 (名古屋大学) が、哺乳類培養細胞における時計遺伝子発現リズムのリアルタイムモニター系を活用した、時計タンパク質の性状解析や時計発振に影響を与えるキナーゼ阻害剤のスクリーニングについて講演されました。岡野俊行先生 (早稲田大学) は、ニワトリの新規クリプトクロームファミリー分子であるCRY4の同定と分子解析について講演されました。中道範人先生 (名古屋大学) は、シロイヌナズナの概日時計機構について、PRR分子群の機能解析を発表されました。黒

澤元先生 (東京大学) は、シアノバクテリアの概日時計機構について、Kaiタンパク質群の調節を中心とした数理モデルを発表されました。土居雅夫先生 (神戸大学) は、マウスの概日時計機構に関与するタンパク質フォスファターゼとして、MKP1の分子解析を発表されました。吉村崇先生 (名古屋大学) は、ウズラの光周性応答の分子機構について、甲状腺ホルモン、インスリン受容体、および性ホルモンの役割を発表されました。岩崎秀雄先生 (早稲田大学) は、シアノバクテリアのリズミックな遺伝子発現におけるSasA-RpaAの役割について講演されました。堀川一樹先生 (東京大学) は、ゼブラフィッシュの初期発生における体節形成リズムについて、転写因子Hesの機能解析を発表されました。

ショートトークでは、小山時隆先生 (名古屋大学) が、シアノバクテリアKaiタンパク質の一アミノ酸変異がリズム周期に与える影響について、大規模スクリーニングの結果を発表されました。羽鳥恵先生 (東京大学) は、ニワトリ松果体の光同調機構における転写因子SREBPの役割について講演されました。稲垣奈都子先生 (北海道大学) は、マウス視交叉上核における*Per1* 遺伝子発現リズムの長日条件下と短日条件下での変化について講演されました。中島歩先生 (広島大学) は、転写因子DEC1による時計遺伝子の発現調節について、*Dec1* ノックアウトマウスの細胞などを用いた解析の結果を発表され

ました。最後に池田真行先生（富山大学）は、マウスの光同調機構におけるコレシストキニンA受容体の役割について講演されました。

ワークショップのタイトル通り、時計機構の分子研究について、最新の成果発表を聞くことができ、いい刺激を受けさせて頂きました。冒頭にも述べましたように、非常に多くの聴衆の皆様にお集り頂けたのですが、質問時間など、もう少し活発なディス

カッションがあると良かったように思います。演題数を増やそうと欲張ったため、スケジュールがタイトになってしまったのが一因であろうと反省しております。最後になりますが、講演を引き受けてくださった演者の皆様、およびワークショップの進行を手伝ってくださった大会スタッフの皆様にこの場を借りて心よりお礼申し上げます。

ワークショップW3「メタボリックシンドロームとリズム」総括

前村浩二

東京大学大学院医学系研究科循環器内科

2006年11月30日-12月2日、第13回日本時間生物学学会が開催された。今年はDr. Serge Daanの国際生物学賞受賞記念シンポジウムとの同時開催となり、東京国際フォーラムで盛大に行われた。初日に行われたワークショップ3「メタボリックシンドロームとリズム」の概要をご紹介します。

ライフスタイルの欧米化に伴い糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満などが増加し、その結果として心筋梗塞、脳梗塞など動脈硬化を基盤とする疾患の罹患率が増加している。以前はそれぞれの危険因子が独立して動脈硬化の進展に寄与すると考えられたが、同一人で糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満を合併することが多く認められ、発症にいたる共通の病態があると考えられるようになった。その後の研究により、これは内臓脂肪の蓄積とそれに続くインスリン抵抗性を基盤とした一連の病態と考えられ、メタボリックシンドロームと呼ばれるようになった。メタボリックシンドロームの診断基準では、男性で腹囲85cm以上、女性で90cm以上（内臓脂肪100cm²に相当するとされる）に加え、脂質代謝異常（中性脂肪150mg/dl以上かつ、またはHDLコレステロール40mg/ml未満）、血圧高値（収縮期血圧130mmHg以上かつ、または拡張期血圧85mmHg以上）、糖代謝異常（空腹時血糖値110mg/dl異常）のいずれかひとつを合併するものとされる。

メタボリックシンドロームを早期発見し、動脈硬化への進展を予防することにより、心筋梗塞、脳梗塞などの疾患を抑制しようとする政策上のバック

アップもあり、メタボリックシンドロームは最近様々な学会や雑誌の特集で取り上げられている。またマスコミでも毎日のように取り上げられて一般の人の関心も非常に高くなっている（もっとも男性で腹囲85cm以上、女性で90cm以上という基準が一人歩きしてやや過熱気味の感もあるが）。メタボリックシンドロームは過食、運動不足を主体とするライフスタイルにより惹起されることより、定期的な食事、睡眠などの生活リズムがその発症に大きく関与しているものと考えられる。また血圧や心拍数などの心血管系機能や、不整脈、心筋梗塞などの循環器疾患の好発時間には明らかな日内変動が見られ、体内時計と密接に関連していると考えられる。実際、時計遺伝子と脂肪細胞分化の関連、体内時計の変異したマウスでの体重増加の異常、シフトワーカーでの心血管事故の増加などが最近相次いで報告されている。また体内時計は中枢のみでなく、脂肪、心臓、血管などの組織にも存在し、メタボリックシンドロームによりこれらの末梢体内時計が変調を来していることも報告されている。従って、最近の体内時計の分子メカニズムの爆発的な解明が、今後メタボリックシンドロームの病態の解明、予防、治療に発展することが期待されている。本ワークショップにおいては、メタボリックシンドロームの発症および予防、治療における体内時計の役割を、特に脂肪細胞、肥満、糖尿病、血圧日内変動パターン観点から討議を行った。なお食習慣、食物吸収にも体内時計が関与しているが、このテーマは柴田先生がオー

ガナイズされたワークショップ1「時間栄養学－食とリズム」で討議された。

まず日本大学薬学部、榛葉繁紀先生が時計遺伝子による脂肪細胞機能の調節について講演された。従来、脂肪細胞は食事由来の過剰なエネルギーを貯蔵することを目的とした受動的な細胞と考えられていたが、近年、脂肪細胞が様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)を産生分泌し、それが各臓器の代謝調節を行うこと、さらにはそのバランスの乱れがインスリン抵抗性を誘発し、メタボリックシンドロームの発症につながるということが明らかになっている。脂肪組織でも他の組織と同様に末梢体内時計が存在し、また種々のアディポサイトカインの発現には概日リズムが見られた。さらに皮下、内臓、精巣など脂肪組織の部位により概日リズムの位相が異なっていたがこの意義については今後の課題である。次に脂肪細胞は線維芽細胞から分化するが、この分化の過程に時計遺伝子のひとつであるBMAL1が関与していることが3T3L1細胞を用いたin vitroの研究で明らかになった。さらにマウスに高脂肪食を負荷すると脂肪組織でBMAL1の振幅が大きくなったが、肝臓では変化が認められなかった。この脂肪組織における時計遺伝子の振幅の変化にはアラキドン酸の関与が示唆された。このことは食事により脂肪組織の体内時計の状態が変化し、これがメタボリックシンドロームの病態に関与していることを示唆している。演者らは、脂肪細胞特異的にBMAL1を過剰発現するマウスや、ノックアウトマウスを作成しており、その結果が待たれる。

次に産業技術総合研究所・生物時計研究グループ、大石勝隆先生が、肥満及び糖尿病と体内時計の関係について講演された。血液線溶活性には概日リズムが存在し、心筋梗塞などの血栓症の時刻依存的な発症の一因と考えられてきた。ヒトと同様にマウスでも活動開始時期に血漿PAI-1値が最高値に達し、線溶活性が最低となる概日リズムが観察された。一方clock変異マウスでは、PAI-1発現が恒常的に低値を示し、線溶活性は上昇していた。糖尿病や肥満などの病態には血中PAI-1の増加に伴い線溶活性が低下することが知られている。clock変異マウスにストレプトゾシン(STZ)を投与して糖尿病を誘発するとPAI-1遺伝子発現量の増加が顕著に抑制されていた。またclockとレプチン遺伝子obの二重変異により肥満を呈するclock;obマウスでは、obマウスに比して肥満が促進されるにも関わらず、obマウスで見られる血中PAI-1の増加が完全に抑制され

ていた。以上より時計遺伝子clockは転写因子としてPAI-1遺伝子の日周発現を直接制御するだけでなく、糖尿病や肥満に伴うPAI-1発現の亢進にも大きく関わっている可能性が示された。

次に自治医科大学循環器内科、苅尾七臣先生が血圧日内変動と循環器疾患についての最新知見を講演された。脳血管障害や心筋梗塞などのあらゆる循環器疾患の発症は、早朝から午前中にピークを示し、夜間睡眠と共に低下する日内変動を示す。血圧には日内変動がみられ、その変動異常が循環器疾患のリスクを増加させ、発症時間帯にも影響を与える可能性がある。高齢者高血圧患者を対象とした自治医科大学のABPM研究により、血圧モーニングサージが24時間血圧レベルとは独立して脳卒中のリスクとなることが明らかになった。一方、正常の血圧日内リズムが障害され、夜間血圧下降が消失しているnon-dipperや、逆に夜間血圧が上昇するriserでは、脳卒中や心不全をはじめとする循環器疾患や死亡のリスクが増加していた。このことは、血圧の概日リズムがいかに臓器障害に関与しているかを示唆している。さらに近年、注目を集めている睡眠時無呼吸症候群(SAS)では著しく睡眠の質が低下し、夜間血圧下降が障害され、高血圧や循環器疾患のリスクが増加する。演者らが開発した睡眠時無呼吸発作時の血圧とその変動を特異的に測定する夜間トリガー血圧計は、SAS患者の血圧“ミッドナイトサージ”を検出した。このサージは重症SAS患者では100mmHg程度にも達しており、血圧日内変動を修飾し、夜間発症の循環器疾患のトリガーになると考えられた。

最後に千葉大学循環病態医科学、南野徹先生が老化、血圧日内変動と体内時計について講演された。ヒトは老化に伴い様々な日内リズムの障害形質を示すようになる。高齢者において認められるnon-dipper型の高血圧は脳心血管疾患の発症率を増加させることが知られているが、その分子機序については明らかになっていない。血管細胞の分裂寿命は有限であり、最終的には細胞老化と呼ばれる分裂停止状態(senescence)に陥ることが知られているが、演者らはヒト動脈硬化巣において老化した血管細胞が存在し、その病態生理の関与していること、その老化のメカニズムとしてテロメア依存性や非依存性の機序が関与していることを以前から報告している。今回の講演では老化してsenescenceを来した血管細胞では、BMAL1やPer2などの時計遺伝子発現の概日リズムの振幅が低下しており、その機序としてcAMP response element-binding proteinの活性化が

障害されていることを明らかにした。さらにこの細胞にtelomeraseを導入するとこの減弱した振幅が回復した。次に*in vivo*レベルでの研究でも、老化マウスで心血管系の時計遺伝子発現の日内リズムは障害されており、血圧の日内変動が見られなくなることを示した。このnon-dipper型高血圧の病態生理にnitric oxide (NO) が重要であると考えられているが、高齢マウスではその産生が著しく障害されていた。驚くべきことにNOを高齢マウスに投与すると心血管系の時計遺伝子発現の日内リズムは正常化し、それに伴いnon-dipper型の血圧変化も改善したことから、NOによる心血管系の時計遺伝子発現の日内リズムの制御がnon-dipper型の高血圧の病態生理に

重要であることが明らかになった。荻尾先生の講演で明らかのように、夜間に血圧が下がらない日内変動パターンは心血管病発症のリスクを高めることが知られているが、そのメカニズムの解明、治療法に結びつく可能性が示された。

メタボリックシンドロームの発症、進展における体内時計の役割はようやく研究が始まったばかりであるが、今回のワークショップで、その意義が今後ますます注目されるであろうことが確信された。本ワークショップが、今後メタボリックシンドロームの成因を時間生物学の観点から解明し、体内時計を考慮した疾患の予防法、さらに時間に即した治療法の開発に結びつける端緒となれば幸いである。

第5回日本時間生物学会学術奨励賞公募のお知らせ

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、原則として基礎・科学部門1名、臨床・社会部門1名の計2名を表彰することになっております。自薦・他薦を問いませんので、第5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従った記入をお願いいたします。なお、本年度より審査部門の選択を記述していただくことになりました。

■締め切り：平成19年8月31日（金）必着

■あて先：〒202-0021 西東京市東伏見2-7-5

早稲田大学理工学部、電気・情報生命工学科薬理研究室内

日本時間生物学会事務局 柴田 重信

日本時間生物学会学術奨励賞選考委員長

大川匡子（滋賀医科大学）

時間生物学会学術奨励賞候補者調書

1. 希望審査部門：

（ふりがな）

2. 氏名：

3. 生年月日：

4. 現職：

5. 最終学歴ならびに職歴：

6. 学会での表彰歴：

7. 本件に関する連絡担当者名：

8. 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（具体的に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）

第14回日本時間生物学会学術大会のお知らせ

1. 開催概要

期間：2007年（平成19年）11月7日（水）～11月9日（金）

*日本睡眠学会第32回定期学術集会との合同開催となります。

会場：京王プラザホテル

〒160-8330 東京都新宿区西新宿2-2-1 03-3344-0111（代表）

<http://www.keioplaza.co.jp/>

メインテーマ：「睡眠と生物時計の理解に向けて」

*プログラムの詳細はホームページでご案内します。

<http://www.c-linkage.co.jp/jssr-jsc2007/>

2. 演題および抄録のオンライン登録について

本学術大会ではUMINを使用したオンライン演題登録となります。別紙演題募集要項をご参照下さい。合同で16のシンポジウムを予定し、一般演題はすべてポスターセッションを予定しております。

*演題登録期間：2007年6月1日（金）～7月31日（火）（予定）

3. 事前登録のお知らせ

本学術大会では事前登録を行います。ホームページからのオンライン登録のみとなります。詳細につきましてはホームページをご参照下さい。

*事前登録期間：2007年6月1日（金）～9月14日（金）（予定）

4. 宿泊の斡旋について

ホームページにて6月下旬よりご案内いたします。

第14回日本時間生物学会学術大会会長

高橋 敏治（法政大学文学部心理学科教授）

同 副会長

伊藤 洋（東京慈恵会医科大学附属青戸病院院長）

<連絡先>

日本睡眠学会第32回定期学術集会・第14回日本時間生物学会学術大会合同大会事務局

〒102-0075 東京都千代田区三番町2 三番町KSビル

株式会社コンベンション リンケージ内

TEL 03-3263-8688 FAX 03-3263-8693

E-mail: jssr-jsc2007@c-linkage.co.jp

*大会ポスターを同封させていただきましたので貴施設内にご掲示頂き、大会告知にご協力下さいますようお願い申し上げます。

第2回国際時間生物学会

本間研一

WFSC会長

世界時間生物学会連合 (World Federation of Societies for Chronobiology : WFSC) の学術会議である国際時間生物学会 (World Congress of Chronobiology : WCC) の第2回大会が、日本時間生物学会主催、大塚邦明会長のもと、本年11月4-6日東京王プラザホテルで、日本時間生物学会・日本睡眠学会合同学術大会と連携して開催されます。

本大会は、当初Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) が主催する予定でしたが、急遽、日本睡眠学会が第1回に続いてお世話することになりました。WFSC理事会での最終決定が昨年12月上旬であり、組織作りや会場準備に忙殺されていたことから、会員へのご報告が遅れたことをお詫びします。大会運営は主として東京在住の理事にお願いしました。

WFSCは2001年に、日本時間生物学会のイニシアチブのもとに、SRBR、ISCなどの時間生物学に関する各国の学会を結ぶ国際組織として誕生しました。

そして、第1回国際時間生物学会が2003年、札幌市において成功裏に開催されたことは記憶に新しいところです。WFSCの理念は、学際的な学問である時間生物学をさらに発展させるため、それぞれ特徴のある学会や会員の交流の場を提供することにあります。日本時間生物学会はその接着剤として、第2回大会も主催することになりました。今回は、新たにアジアの時間生物学者との交流を心がけています。

大会の詳細については、すでにHP (http://www.ec-japan.jp/wcc2007_1/index.html) で紹介されています。会期は実質2日間で、時間生物・睡眠学会合同大会の直前となっています。高橋敏治時間生物学会大会長、大井田隆日本睡眠学会大会長の全面的な協力を得、合同大会との連携を図る目的で、WCCへの参加者は合同大会にも無料で参加できます (参加登録は共通)。また、懇親会も合同で行われます。UMINによる演題募集が5月から開始されます。多くの会員がWCCに参加し、会を盛り上げて下さい。

日本時間生物学会会則（2006年11月改定）

1章 名称

本会は日本時間生物学会（Japanese Society for Chronobiology）と称する。

2章 目的と事業

1. 本会は、生物の周期現象に関する科学的研究を推進し、時間生物学の進歩発展を図ること、およびその成果を広め 人類の健康と福祉に寄与することを目的とする。
2. 本会は前条の目的を達成するために次の事業を行なう。
 - 1) 学術大会及び総会の開催
 - 2) 会誌等の発行
 - 3) その他本会の目的を達成するために必要とされる事業

3章 組織と運営

（会員）

1. 本会の会員は正会員、名誉会員、賛助会員、臨時会員よりなる。
2. 正会員は、本会の目的に賛同し、所定の手続きを経て、年会費を納めた者とする。正会員の入会及び退会は別に定める規則による。
3. 名誉会員は本会に功労のあった65歳以上の会員で、理事会が推薦し総会の承認を得た者とする。
4. 賛助会員は本会の目的に賛同し、本会の事業に財政的援助を行なう者で、理事会の承認を得た者とする。
5. 臨時会員は、正会員の紹介により、学術集会の参加費を納めた者とする。

（評議員）

1. 評議員は推薦基準に従って正会員を評議員として推薦し、これを理事会が決定する。任期は6年で再任を妨げない。
2. 評議員は学会の活動を積極的に行ない、理事を選出する。

（役員）

1. 本会には次の役員を置く。

理事長1名、事務局長1名、理事若干名、監査委員1名

役員は正会員でなければならない。役員の任期は3年とし、再任を妨げない。
2. 評議員の選挙で評議員の中から理事10名を選出し、総会において決定する。
3. 理事は理事会を組織し、本会の事業を行う。
4. 理事長は理事の互選で選ばれ、本会を代表し、会務を司り、総会および理事会を召集する。
5. 理事会は互選で事務局長を選任し、会の総務、財務を担当させる。
6. 理事会は本会の事業を行うために、必要に応じて専門委員会を設置することができる。専門委員会は評議員から構成され、委員長は理事をあてる。これらの委員の任期は理事の改選までとする。
7. 理事会は評議員の中から監査委員を選出する。理事がこれを兼務することはできない。
8. 理事会は学術大会会長を選出し、総会でこれを決定する。学術大会会長は理事でない場合はオブザーバーとして理事会に参加するように努める。
9. 理事長は理事会の承認を得て、学会の運営に対する助言を行う顧問をおくことができる。顧問は65歳以上の正会員とし、任期は理事会の任期終了までとする。

（総会）

1. 本会の事業および組織・運営に関する最終の決定は、総会の議決による。
2. 総会は、正会員より構成される。定期総会は原則として毎年1回開催され、理事長がこれを招集する。
3. 定期総会の議長は、大会会長がこれにあたる。

4. 理事長が必要と認めた場合、あるいは正会員の4分の1以上 または理事の2分の1以上の要請があった場合には、理事長は臨時総会を招集する。
5. 総会の議決は、出席者の過半数の賛成を必要とする。

(学術大会)

学術大会は、原則として毎年1回開催し、その企画・運営は学術大会会長がこれにあたる。

4章 会計

1. 本会の年度会費は、別に定める細則により納入するものとする。
2. 本会の会計年度は、毎年1月1日に始まり、12月31日に終わる。

5章 会則の変更

本会の会則の改正は、理事会の審議を経て、総会における出席者の3分の2以上の同意を経なければならない。

付則

1. 本改正会則は、2001年1月1日から施行する。
2. 本改正にともない、旧会則の学会会長、運営委員、専門委員はそれぞれ、理事長、理事および専門委員に就任し、任期は2001年度までとする。
3. 本改正にともない、運営委員会は評議員候補者を選出し、総会へ推薦する。

会則施行内規

1. 入会及び退会手続き

正会員の入会は、所定の様式により、事務局長まで届け出、理事会の承認を得なければならない。また退会しようとする者は、事務局長まで書面をもって届け出なければならない。

2. 会費納入

- 1) 正会員の年会費は、5,000円とする。ただし大学院学生等は3,000円とする。
- 2) 名誉会員は会費及び学術大会参加費を免除する。
- 3) 賛助会員の年会費は、1口、20,000円とする。
- 4) 年会費の改訂は総会の議決を必要とする。
- 5) 会費未納2年以上経過した会員には、学会誌の発送を停止し、会費納入の督促を行う。
- 6) 長期にわたり年会費を滞納した者は、理事会の承認を得て、除名することができる。

3. 評議員の推薦基準

- 1) 評議員の推薦基準は、原則として本会に所属し3年以上の活発な活動を行い、本会の目的とする研究分野および関連分野での十分な研究歴と業績をもつ（筆頭著者としての原著論文2報以上）ものとする。
- 2) 会員歴が3年未満でも、以下の条件を満たす会員は、理事の推薦と理事会の承認があれば、評議員として推薦できる。
 - 本会の目的とする研究分野と関連する分野で5年以上の研究歴を持っていること。
 - 本会の目的とする研究分野に関連する学会に3年以上所属し活発な活動を行っていること。
 - 上記の研究分野および関連分野で筆頭著者としての原著論文が2報以上あること。
 - 年齢が35歳以上であること。
- 3) 学会の活動を積極的に行うため、大会に直近の3年間に少なくとも1回は学術大会に参加することを再任の基準とする。

4. 理事の選出

- 1) 投票は無記名で5名以内の連記とする。
- 2) 理事長は分野を勘案し、5名の理事を評議員の中から追加して任命することが出来る。

5. 専門委員会

以下の専門委員会をおく。

- 編集委員会

- 国際交流委員会
 - 評議委員推薦委員会
 - 広報委員会
 - 将来計画委員会
 - 選挙管理委員会
 - 奨励賞選考委員会
 - 学術委員会
 - その他、理事会が必要と認めたもの。
6. 学会事務局（会計責任者）は事務局長の所属する機関に置く。
7. 日本時間生物学会学術奨励賞の選考基準
- 1) 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。
 - 2) 本章受賞者の年齢制限は、原則として応募時点で37歳以下とする。
 - 3) 上記の目的で理事の中から委員長1名、委員4名より成る選考委員会を設け、公募により募集した候補者の中から本章受賞者を原則として毎年基礎・科学部門1、臨床・社会部門1の計2名選定し、賞金を贈呈する。
 - 4) 委員会は毎年設置し、委員長及び委員を理事会が理事の中から選出し、選考委員の任期は理事の期間とする。
8. 賛助会員に関する取り決め
- 1) 賛助会員の定義
 - 賛助会員は本会の目的に賛同し、本会の事業に財政的援助を行う者で、理事会の承認を得た者とする。
 - 2) 会費
 - 賛助会員の年会費は、一口（20,000円）以上とする。
 - 3) 賛助会員の特典
 - 一口につき1名の大会参加費を事務局が負担する。
 - 日本時間生物学会会誌に賛助会員リストを掲載し、謝意を表す。
 - 日本時間生物学会会誌に広告記事を掲載できるものとする。学会誌への広告記事の掲載は1年間（会費の有効期間）とし、掲載ページの場所と大きさは口数に応じて事務局で判断する。
 - 日本時間生物学会の大会での展示などをする場合は優遇する。
 - 4) 賛助会員の会費の取り扱い
 - 賛助会員の会費を学術大会の運営費に充当する場合は、6割を超えてはならない。
9. 学術大会の発表に関する取り決め
- 学術大会の「一般演題」発表の発表者（登壇者）は会員とする。
10. この内規の改定は理事会の議決を必要とする。

賛助会員リスト (50音順)

以下の団体（代表者、敬称略）からは賛助会員として学会運営にご協力いただいております。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）

三協ラボサービス（株）

（椎橋明広）

株式会社プライムジェイ

（越山順一）

（株）薬研社

（鈴木泰志）

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。原稿のファイルを図表のファイルとともに、編集局へメールの添付書類にてお送りください。念のため、書式付テキスト形式（RTF形式）で保存したファイルも添付するようにしてください。メールで送信できない場合には、プリントアウトした原稿1部（図表を含む）とそれらのファイルを保存したフロッピーディスクまたはCD-ROMなどを編集局へ送付下さい。フロッピーディスクのフォーマット、使用したパソコンの機種、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OS、ワープロソフト、氏名及びファイル名をフロッピーディスクの上に明記して下さい。なお、この場合にも念のため、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者には、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（電子ファイルで投稿の場合には、5）は無くても結構です）

- 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46×2=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）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, 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頁程度。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頁程度とする。

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頁程度。

編集後記

■今回は、高木由臣先生に寿命に関する総説をお寄せいただきました。以前から生物時計と寿命との関係は興味深い問題として扱われてきましたが、最近特に注目されつつあります。参考にさせていただければ感謝です。大戸茂弘先生の抗がん薬の時間治療に関する総説は、臨床における体内時計の重要性を強く認識させるものです。石松愛、武田洋幸、堀川一樹先生には、形態形成のリズムを分子レベルで解析した研究をまとめていただきました。いずれも、力作であり、読み応え十分です。一方、また、中島芳浩先生のグループにはルシフェラーゼによるマルチカラーレポーターアッセイの技術ノートをお寄せいただきました。この手法は今後ますます威力を発揮すると思います。

■本年は新年早々に近藤孝男会員が朝日賞受賞のニュースがありました。昨年の国際生物学賞に続き、時間生物学分野からの受賞であり、私たちの学会にとっても喜ばしいことと思います。さらに、今年度は学術大会が日本睡眠学会との合同で、東京で開催されますが、それに先駆けて第2回国際時間生物学学会が同じ会場で開催されます。このような意味で、今年は私たちの学会にとりましても特別な年と言えそうです。会員の皆様のますますのご活躍を記念する次第です。

時間生物学 Vol. 13, No. 1 (2007)

平成19年5月31日発行

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

(事務局) 〒202-0021 西東京市東伏見2-7-5

早稲田大学理工学部、電気・情報生命工学科薬理研究室内

Tel: 0424-61-1291 Fax: 0424-50-2271

(編集局) 〒700-8530 岡山市津島中3丁目1-1

岡山大学大学院自然科学研究科、時間生物学研究室内

TEL&FAX: 086-251-8498

(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