

に胎生15日以降)腹側部 medial ganglionic eminence 由来の介在ニューロンである。この欠落が背側部低形成の一因であると推測される。

以上のことから、SHHが前脳の形態形成において、増殖能の制御等を通じて「大きさ」「形」の決定に重要な役割を果たしていることが示された。しかしながら、*Shh*, *Smo* コンディショナルノックアウトマウスにおいて、増殖は完全に停止したわけではなく、FGF, WNT等、他のシグナルとの統合、タイミング等が重要であると考えられる。今後は複数のシグナルを受け取った細胞がどのように振る舞うのかを詳細に検討することが大切であろう。

- 1) Del Amo, F.F., Smith, D.E., Swiatek, P.J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R.J., McMahon, A.P., & Gridley, T. (1992) *Development*, 115, 737-744.
- 2) Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquié, O., Ish-Horowitz, D., & Lewis, J. (1997) *Curr. Biol.*, 7, 661-670.
- 3) Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., & Israel, A. (1995) *Science*, 377, 355-358.
- 4) Otsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., & Kageyama, R. (1999) *EMBO J.*, 18, 2196-2207.
- 5) Shimamura, K. & Rubenstein, J.L. (1997) *Development*, 124, 2709-2718.
- 6) Fukuchi-Shimogori, T. & Grove, E.A. (2001) *Science*, 294, 1071-1074.
- 7) Joyner, A.L., Liu, A., & Millet, S. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 736-741.
- 8) Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., & Takada, S. (1997) *Nature*, 389, 966-970.
- 9) Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., & Jessell, T.M. (1991) *Cell*, 64, 635-647.
- 10) Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., & Beachy, P.A. (1996) *Nature*, 383, 407-413.
- 11) Ishibashi, M. & McMahon, A.P. (2002) *Development*, 129, 4807-4819.
- 12) Saitsu, H., Komada, M., Suzuki, M., Nakayama, R., Motoyama, J., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2005) *Dev. Dyn.*, 232, 282-292.
- 13) Dahmane, N., Sánchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., & Ruiz-i-Altaba, A. (2001) *Development*, 128, 5201-5212.
- 14) Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2008) *Development*, 135, 2717-2727.
- 15) Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C., & Lai, E. (1995) *Neuron*, 14, 1141-1152.

石橋 誠

(京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻
リハビリテーション科学コース)

Roles of signaling molecules for cell-to-cell communication during development of the central nervous system

Makoto Ishibashi (Department of Physical Therapy, Human Health Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 53 Syogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto City, Kyoto 606-8507, Japan)

シアノバクテリアの概日時計の出力系

はじめに

多くの生物は、約24時間で振動する「時計」を体内、もしくは細胞内に持っている。これは概日時計(サーカディアンクロック)と呼ばれており、昼夜の環境変動や一年の季節変化に応じた生命活動の基軸となっている。この基本振動を生み出すのが概日時計システムの「振動体」であり、一定の環境下においても自律的に振動することが可能である。しかし、その周期長は地球の自転周期と同じではない。季節・生息地によって昼夜の長さが変わるため、昼夜に伴う光や温度などの変化を利用して、周期的環境変動と概日時計の振動を日々同期させる必要がある。このような外界の刺激を振動体に伝えるための信号伝達経路を、概日時計システムの「入力系」という。一方、振動体はただ振動しているだけでは意味が無く、それによって生み出された時間情報を遺伝子発現などの生理現象に変換するためのシステムが必要である。これを概日時計システムの「出力系」と呼ぶ。概日時計システムを構成するこれら三つのサブシステムのメカニズムの研究は、原核生物から哺乳類を含めた複数のモデル生物を用いて、それぞれ精力的に進められている。本総説では、酸素発生型の光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアの一種、*Synechococcus elongatus* PCC 7942の概日時計の出力系に焦点を絞り、最近の筆者らの知見を含めて紹介する。

1. シアノバクテリアの概日時計の振動体

出力系の話をする前に、シアノバクテリアの概日時計の振動体について、この節で簡単に説明しておく。シアノバ

クテリアの概日振動体は三つのタンパク質, KaiA, KaiB, KaiC から構成されており, それらは隣接する二つの転写単位, *kaiA* および *kaiBC* にコードされている¹⁾. KaiC は自己リン酸化活性および自己脱リン酸化活性を持ち^{2,3)}, 隣り合った2箇所のリン酸化部位を規則的にリン酸化および脱リン酸化する^{4~7)}. KaiA と KaiB は, KaiC のリン酸化をそれぞれ正負に調節する活性を持つ^{2,8)}. この KaiC のリン酸化状態はシアノバクテリアの細胞内において約24時間周期で振動し, 概日時間 [CT; 概日振動の1周期を24で割ったものを1単位とする. ここでは夜明けに相当する時間 (主観的夜明け) をCT 0とする] に換算すると, 主観的夜中にあたるCT 16前後でリン酸化のピークを迎える. 最も重要なことは, これら3種類の精製 Kai タンパク質と ATP を試験管内で混合し保温することで, KaiC のリン酸化状態を約24時間周期で振動させることが可能であるということである⁹⁾. この概日振動の試験管内再構成の成功は, KaiA, KaiB, KaiC タンパク質からなる周期的な化学反応系こそが, シアノバクテリアの振動体の要になることを明確に示した. この KaiC を中心とした振動体の解析の詳細については, 大川 (西脇) が本誌で解説しているので参照されたい¹⁰⁾.

2. 時計遺伝子の転写・翻訳のフィードバック

時計遺伝子の産物が自己の発現を抑制したり, 他の時計遺伝子の発現を活性化したりする現象は, 生物種を問わず普遍的に観察される. 例えばシアノバクテリアでは, KaiC の過剰発現は *kaiBC* の転写を抑制 (KaiC の負のフィードバック制御) する一方で, KaiA の過剰発現は *kaiBC* の転写を活性化できる¹⁾. このような正負の転写制御を組み合わせることで, 持続的な転写の振動を生み出すことが理論的に可能であることから, これら時計遺伝子の転写翻訳を介したフィードバック制御こそが概日時計の振動体の本体だと長く信じられてきた. しかし先述のとおり, KaiC リン酸化サイクルの試験管内再構成によって, 少なくともシアノバクテリアの概日時計ではそのようなフィードバック制御による振動システムは必要ないことが明らかとなっている. シアノバクテリアにおいては, 時計遺伝子を含む転写制御系は概日時計の出力系の一部と考えられている. また最近では, Kai タンパク質群で構成される振動子と共役した転写・翻訳のフィードバックループが, 概日時計システム全体の頑健性を高めている可能性が指摘されている¹¹⁾. 上述の KaiA による *kaiBC* 発現の活性化には *kaiC* 遺伝子が必要であり, 一方 *kaiA* 遺伝子破壊株

で KaiC を過剰発現させると (野生株での場合と逆に) *kaiBC* 遺伝子発現を活性化させることができることから²⁾, KaiC はその量的・質的な状態に応じて *kaiBC* 発現を正負のどちらにも制御でき, 細胞内でのリズム的な KaiC の状態変化によって概日遺伝子発現が生み出されていると考えられる. では KaiC を中心とした振動体は, どのようにして転写を正負に制御しているのだろうか? 近年それら転写制御に関与する概日時計の出力系因子, SasA (*Synechococcus adaptive sensor A*), RpaA (regulator of phycobilisome-associated A), LabA (low-amplitude and bright A) が相次いで同定された. 以下にそれらについて解説する.

3. 正の出力系因子 SasA

SasA は典型的な二成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼであり, KaiC と相互作用する因子として酵母ツーハイブリッド法により単離された¹²⁾. SasA は N 末端側に KaiB 様の配列を持ち, この領域を介して KaiC と結合する. *kaiBC* をはじめとした様々な概日リズムを持つ遺伝子の発現量が, *sasA* 遺伝子の欠損によって著しく減少したことから (図 1A), *sasA* は概日遺伝子発現の正の制御因子であると考えられる. それに伴い, *sasA* 破壊株では細胞内の KaiC タンパク質の蓄積量が著しく減少する. また *sasA* 破壊株は, 概日遺伝子発現の周期が2~3時間短くなる短周期の表現型を示す (図 1A). 一方 SasA の過剰発現は, 概日遺伝子の発現量や位相を変化させるなど, 概日時計の機能に強い影響を与えることができる. 加えて, *sasA* 破壊により12時間毎に明期と暗期が交代する明暗サイクル中での生育能力が損なわれることから, SasA は周期的な環境変動に応答した代謝システムにも関与していると考えられる.

4. SasA のレスポンスレギュレーターである RpaA の同定

一般的に二成分制御系では, ヒスチジンキナーゼと, それからリン酸基を受け取ること (リン酸基転移) で活性化するレスポンスレギュレーターと呼ばれるタンパク質 (転写因子が多い) が対になって機能する. SasA のレスポンスレギュレーターを同定するため, ゲノムからレスポンスレギュレーター様のオープンリーディングフレームを同定し, それらを網羅的に破壊し, 概日遺伝子発現への影響を調べた¹³⁾. その結果, *kaiBC* 遺伝子発現がほぼ消失する変異株を同定した. この変異株の表現型の責任遺伝子が

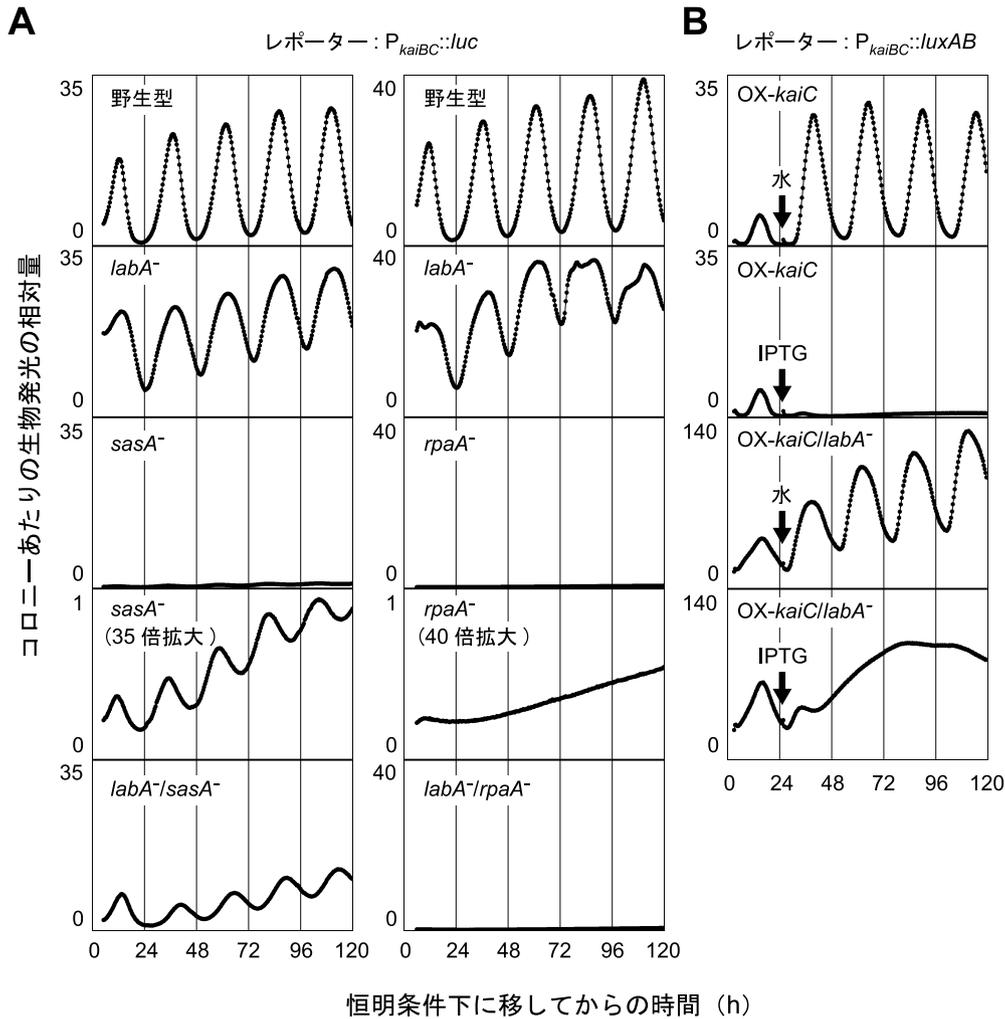


図1 シアノバクテリアの概日時計の出力系に関する遺伝子の破壊株の表現型
 (A) *kaiBC* のプロモーター活性を生物発光でモニタリングするため、*kaiBC* プロモーターの下流にホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*) を連結した発光レポーター ($P_{kaiBC}::luc$) を *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に導入した (AMC541 株)。AMC541 株において概日時計の出力系に関する各遺伝子を破壊し、明暗サイクル下で同調後、恒明条件下 ($40 \mu E m^{-2} sec^{-1}$) に移し、発光基質であるルシフェリンの存在下で各株の生物発光リズムを測定した。*labA* はスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入することで、*sasA* および *rpaA* はカナマイシン耐性遺伝子と置き換えることでそれぞれ破壊した。*kaiBC* の制御における各因子の関係を調べるため、それらの二重破壊株も作製した。野生型は AMC541 株そのものを示す。本データは文献 14 より改変して示す。
 (B) *kaiBC* プロモーターの下流に *Vibrio harveyi* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) を連結した発光レポーター ($P_{kaiBC}::luxAB$) を導入した *S. elongatus* PCC 7942 (NUC42 株) に、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) により下流の遺伝子発現を誘導できる *trc* プロモーターに *kaiC* 遺伝子を連結した KaiC 過剰発現コンストラクト (OX-*kaiC*) を導入した株 (OX-*kaiC*/NUC42) を用意し、その株の *labA* 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊した (OX-*kaiC*/*labA*⁻/NUC42)。明暗サイクルで同調後に恒明条件下 ($40 \mu E m^{-2} sec^{-1}$) に移し、発光基質であるデカナルの存在下で各株の *kaiBC* のプロモーター活性を生物発光により測定した。恒明条件下に移して約 24 時間後に、KaiC の過剰発現を誘導するために 1 mM の IPTG (もしくは陰性対照のための水) を添加した (矢印)。

rpaA である。*rpaA* 破壊株では *kaiBC* を含めた概日遺伝子発現の消失 (図 1A), KaiC の蓄積量の著しい減少, 明暗サイクル中での生育能力の著しい減少が観察され, それら表現型は *sasA* 破壊株のそれと極めて類似していた. この事実は RpaA が SasA のレスポンスレギュレーターとして機能していることを示唆する. また, 精製した組換えタンパク質を用いた実験により, KaiC 依存的に SasA は自己リン酸化反応を活性化し, RpaA へリン酸基が転移することが確認された. さらに, Kai タンパク質群と ATP を混合した *in vitro* 概日時計再構築系に SasA, RpaA タンパク質を添加すると, KaiC のリン酸化のみならず, SasA-RpaA のリン酸基転移反応も約 24 時間周期で振動した. RpaA のリン酸化のピークの位相は, KaiC のリン酸化のピークと比較して, 4~8 時間前進していた. 先述のとおり, 細胞内における KaiC のリン酸化は CT 16 辺りで最大になることから, この *in vitro* 再構築系の結果を考慮すると, 細胞内における SasA-RpaA のリン酸基転移のピークは CT 8~12 (主観的昼から夕方) だと考えられる. これは *kaiBC* の発現のピークが CT 9~12 あたりになる事実と一致する. これらのことから, KaiC と相互作用する SasA-RpaA 二成分制御系が Kai タンパク質振動体の時間情報に従い活性化することで, 主に主観的昼に *kaiBC* をはじめとした概日遺伝子発現を正に制御するというモデルが提唱された (図 2). RpaA は DNA 結合ドメインと予測される領域を持つ典型的な OmpR 型のレスポンスレギュレーターであり, 遺伝子発現制御に関する概日時計の出力系で転写因子として機能すると予測されている.

5. KaiC の負のフィードバック制御に関与する新規遺伝子 *labA*

負の出力系因子をコードすると思われる遺伝子 *labA* は, KaiC の過剰発現による転写抑制に関与する因子として同定された¹⁴⁾. *kaiBC* プロモーターに *Vibrio harveyi* 由来の生物発光遺伝子 *luxAB* を連結した発光レポーター ($P_{kaiBC}::luxAB$) を保持したシアノバクテリア株中で KaiC を過剰発現させると, *kaiBC* プロモーターの活性が強く抑制され, *luxAB* レポーターの発現がほぼ停止し, その結果生物発光がほとんど検出できなくなる (図 1B). 一方この株中で *labA* を破壊すると, KaiC を過剰発現させても *kaiBC* プロモーターは抑制されず, 高い生物発光レベルを維持する (図 1B). このことから, *labA* は KaiC の負のフィードバック制御に必須な遺伝子であると考えられる. また, *labA* 破壊株では *kaiBC* の概日遺伝子発現の谷の部分のレ

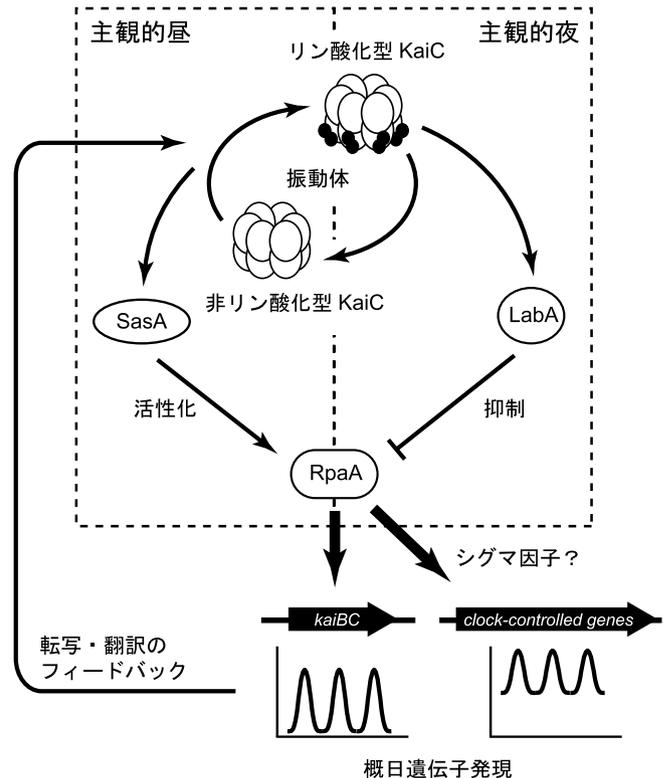


図 2 シアノバクテリアの概日時計の転写・翻訳のフィードバックに関する出力系のモデル図 (文献 14 より改変)

本モデルでは, KaiC を中心とした Kai タンパク質振動体により刻まれる時間情報を元に, SasA は主観的昼に RpaA を活性化する. 一方 LabA はリン酸化型 KaiC の蓄積量の情報に従い, 主観的夜に RpaA の活性を抑制する. RpaA の活性を通してプロモーターの活性が調節され, リズミックな概日遺伝子発現が生み出される.

ベルが上昇し, 低振幅のリズムを示す (図 1A および B). それに伴い, 細胞内の KaiC の蓄積量も増大する. これらのことは, *labA* は主観的夜の位相において *kaiBC* の概日遺伝子発現を抑制する遺伝子であることを示唆している. また, KaiC の負のフィードバック制御にはリン酸化型 KaiC が強く関与していることが示唆されており⁴⁾, LabA の機能もリン酸化型 KaiC に依存していると考えられる. 実際に, リン酸化型 KaiC の蓄積量が最大になる時間帯は主観的夜 (CT 16 近辺) であり, *labA* 破壊株から予想される *labA* の機能する時間帯と一致する.

さらに重要な点として, *labA* 破壊により *sasA* 破壊の表現型を抑圧できることがあげられる. 先述のとおり *sasA* 破壊株では *kaiBC* プロモーター活性が著しく低下するが, *labA/sasA* 二重破壊株においてはそれが部分的に回復する (*sasA* 破壊株と *labA* 破壊株の間となる) (図 1A). それ

に伴い, *sasA* 破壊株で激減した KaiC の蓄積量も回復する。さらに, *sasA* 破壊株の短周期の表現型 (図 1A) や明暗サイクル中での生育も部分的に回復する。これらの事実は, *labA* と *sasA* が概日時計の出力系ではそれぞれ独立の経路上で機能していることを示唆する。一方, *labA/rpaA* 二重破壊株の *kaiBC* プロモーター活性は, *rpaA* 破壊株のそれと同様であった (図 1A)。このことから, *kaiBC* プロモーターの活性制御に対して, *labA* と *rpaA* は同一の経路で機能していると考えられる。加えて, *rpaA* の過剰発現による *kaiBC* プロモーター活性の抑制は, *labA* 破壊によって影響されないことから, *kaiBC* の転写制御において *rpaA* は *labA* の下流で機能していると考えられる。筆者らはこれらの遺伝学的な解析の結果から, KaiC からの時間情報が, SasA の関与する正の制御経路と LabA の関与する負の制御経路に別れ, 後に RpaA に集約するモデルを提唱した (図 2)。このモデルにおいては, 主観的昼の時間帯ではリン酸化反応が進行する状態の KaiC が SasA-RpaA を介して *kaiBC* プロモーターを活性化し, 一方で主観的夜では蓄積したリン酸化型 KaiC 量の情報を元に, LabA-RpaA を介して *kaiBC* プロモーターを抑制する。このように, 概日時計の下流の複数の出力経路が, 異なる位相で同一のプロモーターを活性化もしくは抑制することによって, 高振幅な概日遺伝子発現が実現すると考えられる。現在までのところ LabA と RpaA 間, もしくは LabA と KaiC 間の直接的な相互作用は観察できておらず, これらのタンパク質間には他の因子が介在している可能性がある。

6. シアノバクテリアにおける概日遺伝子発現の多様性

S. elongatus PCC 7942 では *kaiBC* プロモーターだけでなく, ほとんど全ての遺伝子のプロモーターの活性が何らかの概日振動を示すことが, 発光レポーターを用いたプロモータートラップ法により示唆されている¹⁵⁾。定常条件下において, 発現量 (のトレンド), 振幅の高低, 位相, 波形を含め遺伝子発現の変動様式は多種多様であるが, その振動成分に関わる制御系はどれも KaiC に依存しているようだ¹⁶⁾。ではこの出力の多様性はどのように生み出されているのだろうか? 一つの可能性として, 複数の出力経路の組み合わせが考えられる。上記のように SasA 依存的な経路と LabA 依存的な負の経路が RpaA を介して *kaiBC* プロモーターを異なる時間帯に制御している可能性を挙げたが, プロモーター毎に出力の制御経路の組み合わせが異なれば, 多様性を生み出すことが可能であろう。また, シアノバクテリアの中にはプロモーター認識・転写開始に働く

RNA ポリメラーゼのサブユニット (シグマ因子) が複数存在するが, 生育に必須ではないグループ 2 と呼ばれる一群のシグマ因子の破壊もしくは過剰発現によって, 位相や波形などの概日リズム発現変動様式が変化し, それらの影響はプロモーター毎に異なることが観察されている¹⁷⁾。シグマ因子の中にはそれ自身の発現量が概日リズムを示すものが知られており, 時刻依存的な転写制御に働きうると考えられる。このような転写活性を制御する因子の量的な変化は, その下流で制御される遺伝子の概日振動の多様性に寄与しうらう。これに加え, ゲノムワイドに概日遺伝子発現を制御するメカニズムのモデルとして, 「染色体振動モデル」が提唱されている¹⁸⁾。これは概日時計が染色体全体のトポロジーを制御することによって遺伝子発現全体を概日振動させる, というもので, 実際にそのような現象が観察されたという報告もある¹⁸⁾。以上述べてきた, 転写制御に関わる様々な階層の分子機構を介して, 多様な振動様式を生み出していると考えられる。

7. 今後の課題

筆者らが同定した *labA* は生化学的な機能が未知のタンパク質をコードしており, そのパートナーとなる因子の同定を含め, KaiC から LabA, そして RpaA へのシグナル伝達メカニズムを明らかにする必要がある。また, RpaA による転写制御機構も不明であることから, そのターゲットを発見することは, 出力系の理解に極めて重要であろう。さらに, *labA/sasA* 二重破壊株において *kaiBC* プロモーターが明瞭な概日リズムを示すことから, *kaiBC* の概日遺伝子発現制御に対して SasA にも LabA にも依存しない第 3 の出力経路が存在していることは明白である。それらを含め, 複雑な出力経路のひとつひとつを丁寧に解析していくことが, 出力系のネットワークの全体像をとらえ, その多様性の機構を解明する近道であると, 筆者らは考えている。

謝辞

本総説で紹介した筆者らの研究成果は, 名古屋大学大学院理学研究科の近藤孝男教授のご指導の下, 岩崎秀雄博士 (現早稲田大学理工学術院准教授), 片山光徳博士 (現日本大学生産工学部助教), 高井直樹博士 (現名古屋大学大学院生命農学研究科) らをはじめ, 近藤研究室の皆様との共同研究により実施されました。本研究は日本学術振興会, 科学技術振興機構, 武田科学振興財団によりサポートされました。

- 1) Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.-R., Tanabe, A., Golden, S.-S., Johnson, C.-H., & Kondo, T. (1998) *Science*, **281**, 1519–1523.
- 2) Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., & Kondo, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15788–15793.
- 3) Xu, Y., Mori, T., & Johnson, C.-H. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2117–2126.
- 4) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., & Kondo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13927–13932.
- 5) Xu, Y., Mori, T., Pattanayek, R., Pattanayek, S., Egli, M., & Johnson, C.-H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13933–13938.
- 6) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T., & Kondo, T. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4029–4037.
- 7) Rust, M.-J., Markson, J.-S., Lane, W.-S., Fisher, D.-S., & O'Shea, E.-K. (2007) *Science*, **318**, 809–812.
- 8) Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T., & Kondo, T. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2127–2134.
- 9) Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2005) *Science*, **308**, 414–415.
- 10) 大川 (西脇) 妙子 (2008) 生化学, **80**, 833–838.
- 11) Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Terauchi, K., & Kondo, T. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 1513–1521.
- 12) Iwasaki, H., Williams, S.-B., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S.-S., & Kondo, T. (2000) *Cell*, **101**, 223–233.
- 13) Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12109–12114.
- 14) Taniguchi, Y., Katayama, M., Ito, R., Takai, N., Kondo, T., & Oyama, T. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 60–70.
- 15) Liu, Y., Tsinoremas, N.-F., Johnson, C.-H., Lebedeva, N.-V., Golden, S.-S., Ishiura, M., & Kondo, T. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 1469–1478.
- 16) Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 881–885.
- 17) Nair, U., Ditty, J.-L., Min, H., & Golden, S.-S. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 3530–3538.
- 18) Woelfle, M.-A. & Johnson, C.-H. (2006) *J. Biol. Rhythms*, **21**, 419–431.

谷口 靖人¹, 小山 時隆^{1,2}
¹名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
²京都大学大学院理学研究科
 生物科学専攻 (植物学教室)

Output pathways of the cyanobacterial circadian clock
 Yasuhito Taniguchi¹ and Tokitaka Oyama^{1,2} (¹Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464–8602, Japan; ²Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606–8502, Japan)

細胞膜透過ペプチドベクターの開発とメカニズム

はじめに

細胞膜 (形質膜) は細胞の内外を隔てるバリアであり, タンパク質や核酸といった親水性が高い物質は通常細胞膜を透過しない。細胞の恒常性の維持という意味ではこの性質はありがたいものではあるが, 細胞機能を探ったり, 制御するため, あるいは医療目的で, これらの分子を細胞外から細胞内に導入することは一般的に困難である。このため, マイクロインジェクションやエレクトロポレーションといった細胞膜を一過的に破って導入する方法や, 膜融合をもつりポソームを用いて導入する方法などがこれまで用いられてきた。しかし, これらの方法は, 導入効率, 操作の煩雑さ, 細胞に与える損傷の大きさから, 必ずしも満足のいく方法とは言えなかった。

一方では, 膜透過性を有するペプチドをベクターとして用いて, 細胞内にタンパク質をはじめとする膜不透過性の分子を導入する方法が盛んに試みられるようになってきた。膜透過ペプチドは CPP (cell-penetrating peptide), あるいは PTD (protein transduction domain) と呼ばれ, これらの用語を論文で目にする機会も増えてきた。膜透過ペプチドと導入する物質との化学的架橋体あるいは融合タンパク質を調製し, 細胞培養液に加えるだけで, 多くの場合細胞への取り込みの促進が見られる。また, これにより細胞機能が制御された例も数多く報告され, 細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに, 医薬品の新しい送達法としても注目されている¹⁾。本稿では, 膜透過ペプチド