

概日時計システム研究における生化学および構成的アプローチ

はじめに

近年、生命科学研究の中心は、ある現象に關与する分子の同定、解析を中心とした要素還元的な研究から、生体構成分子が複雑に絡み合っ作り上げられる生命システムの動的挙動とその構築原理を理解しようとする統合的研究へシフトしつつある。このような生命科学のパラダイムシフトの中で、生化学のような個々の生体構成分子を対象として発展してきた研究手法が、動的な生命システムの理解を推し進める上でどのように貢献できるだろうか。無論生命システムの統合的シミュレーションを行う際求められる、各種触媒反応や相互作用の定量的パラメーターを求め一手段として生化学の重要性は今後さらに高まるであろう。一方、生命システム研究のモデルシステムとして長年理論・実験の両面から研究が行われた概日時計研究では、単なるパラメーター決定の手段を超えて、生化学が概日時計システムの理解に大きな貢献を果たしてきた。本稿では、生命システム研究における生化学的アプローチについて考察することを目的に、概日時計の生化学および構成的アプローチによる近年の成果について紹介する。

1. 概日時計とは

地球上の生命は地球の自転に伴う環境変化を予測し、生命活動を外部環境変化にあわせて周期的に変動させている。この生命活動に見られる約1日周期の振動は概日リズムと呼ばれ、地球上の生命がほぼ普遍的に備える概日時計に起因する。概日時計の本体であり、概日リズムを生み出す大本の“振動体”は個々の細胞内部に存在し、多くのモデル生物で振動体を中心とした概日時計を構成する遺伝子群（時計遺伝子）とその相互作用ネットワークが明らかにされている。この時計遺伝子はヒトなどの哺乳類と昆虫の間で保存性が見られるものの、その他ではそれぞれのモデル生物固有である場合が大多数であり、保存性は低い。時計遺伝子とそのネットワークの細部は多様であるものの、基本的なメカニズムは共通していると考えられている。つまり時計遺伝子の産物（タンパク質）が自分自身の発現を負に制御する、転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループが振動を生み出す中枢振動体であると言われ

ている¹⁾。概日時計の際立った特徴は、生命活動が約24時間周期で繰り返し振動し続ける点にある。この約24時間周期のリズムは恒常条件下でも継続し（自律性）、光などの外部環境の周期的変化に従い位相を調整することができ（同調性）、さらには生理的溫度内で周期がほぼ不変である（溫度補償性）という性質を備えている¹⁾。これらの性質は細胞内の遺伝子発現制御ネットワークの動的挙動（振動）に依存しており、その周期や位相がどのように決まるのか、なぜ安定で正確な振動が発生するのかを明らかにすることが、概日時計の理解に必須である。

2. シアノバクテリアの概日時計遺伝子

シアノバクテリアは概日時計を持つ最も単純な生物として知られ、各モデル生物に固有な概日時計システムの細部によらない、概日リズム発振の普遍的な基本原理を理解する上で重要なモデル生物である。シアノバクテリア概日時計研究における近年の成果については既に多くの総説が発表されており、詳細に関してはそれらに詳しい^{2,3)}。本稿ではシアノバクテリア概日時計における生化学研究の成果について概略だけ述べるに留める。研究初期に行われた生物発光リズム自動測定装置を用いた大規模変異体スクリーニングの結果、15万に及ぶ変異体の中から、最終的に *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* と名づけられた3種の遺伝子が概日時計で中心的な役割を果たす遺伝子として同定された⁴⁾。3種の Kai タンパク質の一次構造上に DNA と相互作用するモチーフは確認できないものの、その後の解析から、KaiC, KaiA を過剰発現させると *kaiBC* プロモーターの発現がそれぞれ抑制および促進されることが確認された⁵⁾。また ATP 加水分解活性を持つある一群のヌクレオチド結合タンパク質に特徴的に存在する WalkerA および WalkerB モチーフを持ち、自己リン酸化・自己脱リン酸化活性を持つことなども明らかにされた⁶⁾。

3. シアノバクテリア概日時計の試験管内再構成

kai 遺伝子の欠損・過剰発現などの分子生物学的解析から Kai タンパク質が転写調節に關与していることが伺えるものの、Kai タンパク質そのものに転写調節機能に結び付けられる特徴は見出せない。このことは、シアノバクテリア概日時計におけるフィードバック制御が、他のモデル生物とは異なる特殊な仕組みで成立していることを示唆している。鍵となる分子は Kai タンパク質であり、Kai タンパク質の機能が何であるのかを明らかにすることが、概日時計の分子メカニズムの詳細を知るためには欠かせない。同

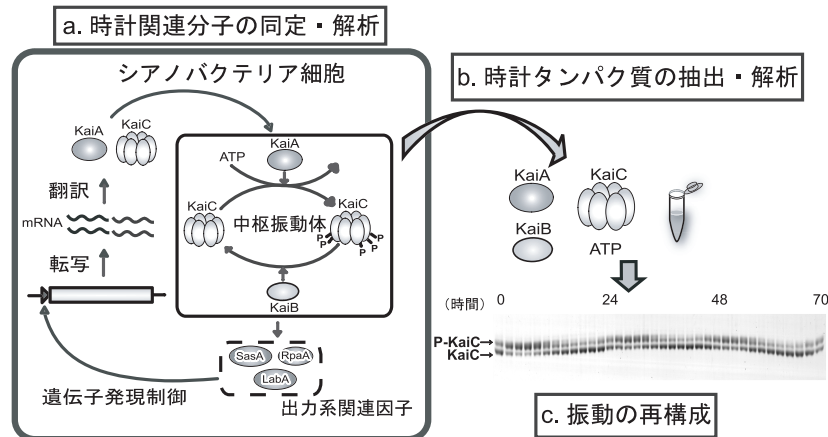


図1 シアノバクテリア概日時計の試験管内再構成

生物発光リアルタイム測定装置を活用した大規模解析や分子生物学的解析により、KaiCリン酸化サイクルを中枢振動体振動とする新しい分子メカニズムが明らかにされた。これらの成果は、現象に対する俯瞰的なアプローチの成果ということもできる。Kaiタンパク質の生化学的解析は、俯瞰的アプローチから得られたシアノバクテリア概日時計システムの分子モデルを試験管内で検証する試みであり、言い換えれば現象に対する仰視的（ボトムアップ的）なアプローチであるということもできる。KaiCリン酸化リズムの再構成は、俯瞰的アプローチと仰視的アプローチが上手く組み合わせられた成果である。

時期に富田らは、光照射のない暗期における転写・翻訳が停止した状態でも KaiCリン酸化リズムが継続していることを明らかにした⁷⁾。このことはシアノバクテリアでは概日リズム発生に転写・翻訳ネガティブフィードバックループが必須でないことを意味している。これらの知見を元に、3種の Kaiタンパク質のそれぞれを精製し ATPと共に試験管内で混合したところ、KaiCリン酸化状態が約24時間周期で振動することが明らかになった（図1）⁸⁾。このリン酸化リズムの周期は温度に依存しないこと、KaiC自己リン酸化・自己脱リン酸化共に非常にゆっくりとした反応であること、KaiC自身が持つATP加水分解活性により制御されていることなど、酵素としてはきわめて特殊な性質を持つことが報告されている⁹⁾。近年では、Kaiタンパク質を中心とした遺伝子発現のネガティブフィードバックループの役割についても再考され、その同調への関与が指摘されている^{10,11)}。このように KaiCリン酸化リズムを中心としたシアノバクテリア概日時計システムの複雑な全体像が徐々に明らかになりつつある。

4. 化合物ライブラリーを用いた哺乳類概日時計関連遺伝子の探索

哺乳類概日時計では、時計タンパク質 BMAL1/CLOCK複合体が *Period* 遺伝子 (*Per1, Per2*) および *Cryptochrome*

遺伝子 (*Cry1, Cry2*) の転写を促進し、その産物である PER1, PER2と CRY1, CRY2が BMAL1/CLOCK複合体の働きを抑制することでネガティブフィードバックループが成立している。現在では正の転写因子である BMAL1/CLOCKと負の転写因子である PER1, PER2/CRY1, CRY2からなるネガティブフィードバックループに加え、多数の転写因子と修飾酵素からなる複雑なネットワークが明らかにされている¹²⁾。近年においても時計関連遺伝子の探索を目的としたスクリーニングが精力的に行われ、それらの成果は概日時計の制御を目的とした創薬におけるターゲット分子としても興味深い。Kayらのグループは、低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、強い周期短縮効果を示す化合物のターゲットがいずれもグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β)であることを突き止めている¹³⁾。我々も同様な化合物スクリーニングを行い（図2, 上段）、非常に強い周期変化をもたらす化合物に着目し解析を進めたところ、大きな周期変化をもたらす上位10種は、結果的にすべて周期延長効果を示すものであり、その10種中9種は既知の標的分子ではなく、カゼインキナーゼ Iε および δ (CKIε/δ) による PERタンパク質のリン酸化の阻害を介して周期に影響を及ぼしていることを明らかにした（図2, 中段）¹⁴⁾。GSK3βや CKIε/δの阻害は、顕著な周期変化をもたらすことが既に知られており、このこと

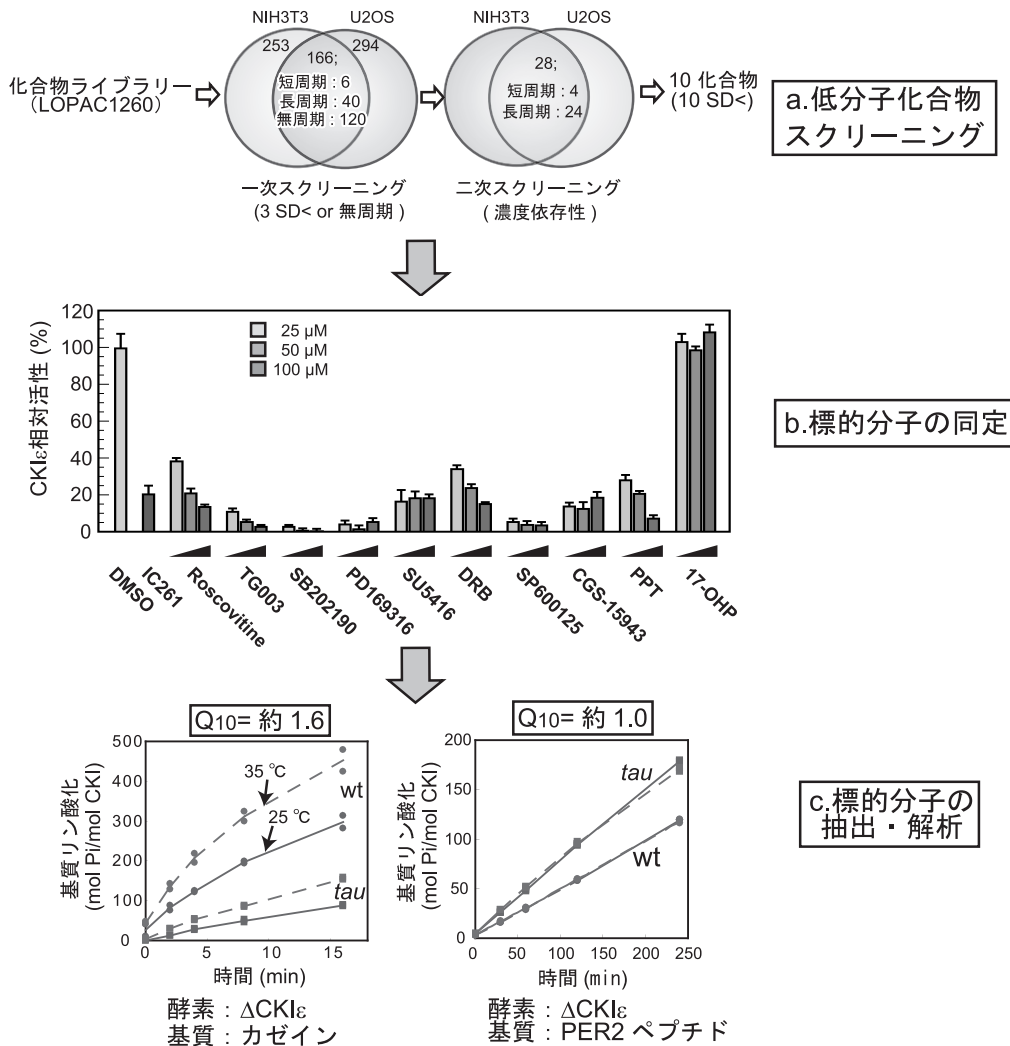


図2 哺乳類概日時計の周期および温度補償性決定メカニズムの解析

(a) 低分子化合物を用いたスクリーニングによる哺乳類概日時計の周期決定に与関する分子の同定。非常に強い周期短縮効果を示す10種の化合物についてその標的分子の同定を行った。(b) スクリーニングにより同定された化合物によるCKIε酵素反応の阻害実験。10種中9種の化合物は強い阻害効果を示した。培養細胞での実験結果¹⁴⁾も同様に、9種の化合物の標的分子がCKIε/δであることを示唆している。(c) CKIε/δ酵素反応の基質および温度依存性の解析。CKIε/δ酵素活性(リン酸化活性)は基質(PER2ペプチド)特異的に温度に非依存であること、短周期となるCKIε/δ突然変異体(*tau*)の反応速度変化がPER2ペプチドを基質とした場合のみ上昇し、表現系と一致する反応特性を示すことが明らかになった。これらの一連のアプローチにより、従来のモデルとは異なった新しい温度補償性の分子モデルを提唱することができた。

は化合物ライブラリーを用いたスクリーニングが概日時計制御分子の探索に有力な手段であることを保証している。

5. 哺乳類概日時計の周期を決める反応

転写・翻訳ネガティブフィードバックループ説に従えば、周期はネットワークを構成する素過程の反応速度の複

雑な関係式で定義されることが予想される。一方、我々が行った化合物スクリーニングの結果は、CKIε/δが概日時計の周期を決める上で重要な役割を果たしていることを示唆している¹⁴⁾。つまり概日時計の周期は、ネットワークを構成する反応の総和で決まるといよりは、CKIε/δによるPERリン酸化反応およびこのリン酸化反応により制御

される PER 分解などの素過程が、哺乳類概日時計の周期を決める上で重要な反応であることを示唆している。

6. 哺乳類概日時計の温度補償性を決める反応

仮に哺乳類概日時計の周期決定において重要な役割を担っている反応の速度が温度依存的に大きく変わるとすれば、温度補償性を成立させることは難しいであろう。そこで培養細胞を用いて CKIε/δ によるリン酸化に依存した PER2 分解の温度依存性を調べたところ、その分解速度も周期と同様温度に非依存であった¹⁴⁾。PER2 の安定性はプロテアソーム系や、CRY との相互作用、さらにはリン酸化の逆反応である脱リン酸化などにより制御されていると考えられており、この培養細胞での結果は、CKIε/δ リン酸化反応の温度依存的な速度上昇の周期長に対する効果を相殺する逆反応とのバランスにより、見かけ上温度非依存になっていると解釈することも可能である。我々はさらに踏み込んで PER2 分解の温度非依存性が何に起因するのかを明らかにするために、精製 CKIε/δ のリン酸化反応を測定したところ、カゼインを基質とした場合は温度依存性を示したものの(温度を 10℃ 上げたときの反応速度増加率、 Q_{10} = 約 1.6)、PER2 のリン酸化部位を参考に設計したペプチド (PER2 ペプチド) を基質とした場合、温度依存性を示さなかった (Q_{10} = 約 1.0) (図 2, 下段)¹⁴⁾。興味深いことに、PER2 ペプチドのリン酸化は、カゼインを基質にした場合と比べて非常に遅い反応であること、さらには短周期変異体である CKIε の tau 変異体 (R178C) はカゼインのリン酸化では活性が低下する一方、PER ペプチドのリン酸化ではむしろ野生型よりも高い活性を示し、この変異体が短周期変異体であることと一致した (図 2, 下段)¹⁴⁾。これらの結果は、CKIε/δ による PER2 リン酸化反応が哺乳類概日時計の周期と温度補償性を規定する上で重要な役割を担う反応であることを示唆している。

7. 生命システム研究における生化学および構成的アプローチ

今回紹介したシアノバクテリアおよび哺乳類における概日時計研究では、いずれも変異体や化合物ライブラリーなどのスクリーニングとネットワークの動的挙動解析の結果、周期や温度補償性などの概日時計の基本特性と密接に関連する分子として、シアノバクテリアにおける Kai タンパク質と哺乳類における CKIε/δ がクローズアップされた。それらのタンパク質分子を細胞から取り出し試験管内で調べることで、概日時計システムの特性を理解する上で

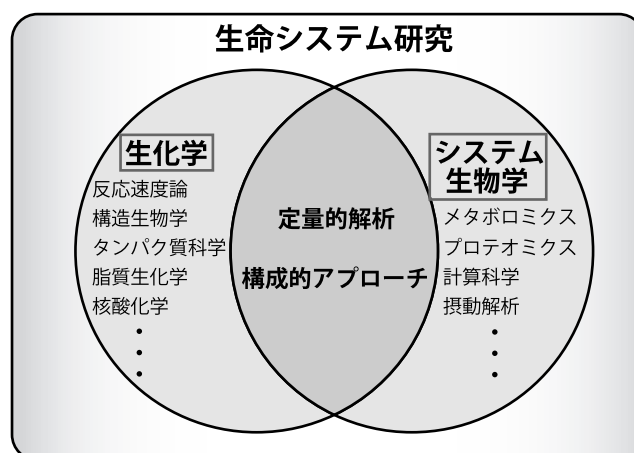


図 3 生命システム研究における生化学を基礎としたアプローチ

生体構成分子の解析を得意とする生化学的手法も、生命システム研究における定量的解析や構成的アプローチの基礎技術として欠かすことができない。

欠かすことができない構成分子の特殊な性質を明らかにすることができた。さらにシアノバクテリアでは、試験管内で概日リズムを再構成することで概日時計の深い理解に繋がった。細胞から分子を取り出して詳細に試験管内で調べてみなければ、その分子の本当の姿を理解することは難しいであろう。

今回紹介した概日時計だけでなく、スクリーニングなどの大規模解析や動的挙動解析の結果クローズアップされる、生命システムの特性と密接に関係する分子を生化学的に解析することで、生命システム全体の性質を理解する上で欠かすことができない重要な知見が得られるかもしれない。試験管内に取り出してその性質を調べるということは、生命現象を試験管内で再構成することでもある。シアノバクテリア概日時計だけでなく、例えばバクテリアの分裂位置を決定する MinDE タンパク質による人工脂質膜上でのパターン形成や¹⁵⁾、バクテリアの分裂リングの試験管内再構成¹⁶⁾などに代表される生命現象の再構成に関する報告例は、生化学などの生体構成分子を取り扱う技術を発展させた構成的アプローチが、動的な生命システム研究の一手法として有力な手段となりうることを示してもいる (図 3)。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、名古屋大学近藤孝男教授および理研 CDB 上田泰己プロジェクトリーダーのご指導のもと、それぞれの研究室の皆様との共同研究により実施さ

れたものです。

- 1) Young, M.W. & Kay, S.A. (2001) *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 702–715.
- 2) 大川 (西脇) 妙子 (2008) *生化学*, **80**, 833–838.
- 3) 谷口靖人, 小山時隆 (2009) *生化学*, **81**, 987–992.
- 4) 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.
- 5) Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., & Kondo, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15788–15793.
- 6) Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., & Kondo, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 495–499.
- 7) Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2005) *Science*, **307**, 251–254.
- 8) Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2005) *Science*, **308**, 414–415.
- 9) Terauchi, K., Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Miwa, K., Murayama, Y., Oyama, T., & Kondo, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16377–16381.
- 10) Mori, T., Williams, D.R., Byrne, M.O., Qin, X., Egli, M., McHaourab, H.S., Stewart, P.L., & Johnson, C.H. (2007) *PLoS Biol.*, **5**, e93.
- 11) Nakajima, M., Ito, H., & Kondo, T. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 898–902.
- 12) Ukai, H. & Ueda, H.R. (2010) *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 579–603.
- 13) Hirota, T., Lewis, W.G., Liu, A.C., Lee, J.W., Schultz, P.G., & Kay, S.A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20746–20751.
- 14) Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R.G., Masumoto, K.H., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S. H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., Sakaki, Y., Takahashi, J.S., & Ueda, H.R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15744–15749.
- 15) Loose, M., Fischer-Friedrich, E., Ries, J., Kruse, K., & Schwillie, P. (2008) *Science*, **320**, 789–792.
- 16) Osawa, M., Anderson, D.E., & Erickson, H.P. (2008) *Science*, **320**, 792–794.

中嶋 正人

(理化学研究所発生再生科学総合研究センター
システムバイオロジー研究プロジェクト 研究員)

Biochemical and synthetic approaches for circadian clocks
Masato Nakajima (Laboratory for Systems Biology, Riken
Center for Developmental Biology, 2-2-3 Minatojima-
minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan)

匂いに対する先天的な恐怖反応を制御する 嗅覚神経回路の発見

はじめに

嗅覚研究において誰もが重要な一歩であったと認識しているのは、1991年のRichard AxelとLinda Buck両博士による嗅覚受容体遺伝子の発見であり、それからほぼ20年の時間が経過した。この20年間の研究によって、嗅覚受容体遺伝子の発現制御や、嗅覚神経回路の形成のメカニズムが徐々に明らかにされてきた。次の飛躍のためには何が必要なのかを模索する中で、私たちが2007年11月に報告した論文は、哺乳類が匂いを嗅いだ時にどのように感じるのかは遺伝的に決められていることを初めて示すものであった。この発見は、哺乳類の情動や行動の少なくとも一部は遺伝的プログラムによって規定されている可能性を示唆していた。本稿では、匂いに対する嫌悪反応や恐怖反応を先天的に制御する嗅覚神経回路の発見と、その後の嗅覚研究の展開について紹介するとともに、嗅覚研究の特徴や、嗅覚研究が脳の理解に与えるインパクトを解説したい。

1. 嗅覚と情動との関係

情動とは、食欲、性欲、母性、恐怖、嫌悪などの生存に欠かすことのできない本能を呼び起こす心の働きであり、ヒトや動物の行動を動機づける要因になる。匂いは複数の種類の情動と結び付き性質がある。例えば、空腹時においしそうな食べ物の匂いがすると脳に食欲の情動が発生し、食べ物の匂いがする方向へ向かっていこうし、腐敗物の匂いがすると脳に嫌悪の情動が発生し、思わず顔を背けてしまおう。動物では、天敵の発する匂いがすると脳に恐怖の情動が発生し、すみ行動や逃避行動を示す。もちろん、視覚系や聴覚系によってもたらされる情報も情動と結び付いていないわけではない。例えば、蛇を見ると恐怖や嫌悪を感じて、逃げ出す人も多いので、蛇の視覚情報は恐怖や嫌悪の情動と結び付いていると考えられる。では、情動を解明するために嗅覚系に着目する理由は何だろうか？

嗅覚系に着目する理由の一つには、私たちの研究によって、特異的な嗅覚神経回路によって様々な種類の情動や行動が先天的に制御されていることが明らかになりつつあることが挙げられる。もう一つの重要な理由は、嗅覚系では