

### 第3回 時計分子の量と質

#### (1) 2000年代の技術革新とシステムバイオロジー

今回は、どのように自然の時計の原理を紐解いて行ったらいいのかという話をした後に、時を刻む仕組みそのものがどういうものなのか、現在分かっているところをお話します。2017年のノーベル医学生理学賞は体内時計の研究で、「分子の量で時が刻まれている」という考え方に与えられたのですが、果たしてそれが正しいのかそれを超える考え方があるのかについてお話します。

生命科学の研究の仕方は2000年ごろに大きな変革期を迎えました。ちょうど今世紀に入ったくらいに、体の中にある遺伝情報が、一応「全部」読みとけたという出来事がありました。遺伝子情報のいわば「文法」とか「単語」はよくわからないままですが、書かれている「文字」そのものが全部読めた、という出来事です。皆さんの体をつくる細胞1つ1つに遺伝子があります。遺伝子 (gene) の総体、全部集めたもの (ome) をゲノム (gene + ome, genome) と言います。ゲノムは約30億文字からかかれています、そこには2万数千個の遺伝子があるぞ、ということが2000年ぐらいに明らかになってきました。30億文字もの情報を解析しようとする計算機を使わないといけないという話になります。また2万数千個もの遺伝子を相手に実験をするためにロボットを使う方法も出てきました。こうした結果、遺伝子の「役者名鑑」、カタログが揃って来ました。

「ファインマン物理学」で有名なリチャード・ファインマン博士にならえば、対象とする仕組みを「作れる」ようになってはじめて「理解できた」ということになります。生命科学もいま、イチからデザインできるまで進めて「理解」に到達しようとしています。2000年あたりに遺伝子のカタログ (ゲノム) が分かってきたことで、ゲノム全体からある現象、例えば体内時計に関わる「役者」を見つけ、その関係性を明らかにすることができるようになってきました。「役者」が見つかった後はその性質を測り予測できるようにします。測れるようになればそれを制御し、制御ができればその仕組みを新たに作ることが視野に入ります。このような2000年代から出てきた生物学の分野を、システムバイオロジーとかシステム生物学 (Systems biology) と言います。ソニーコンピュータサイエンス研究所の北野宏明先生が提唱された考え方です。2000年頃からシステム生物学の名前が世界に広まっていき、アメリカ、ヨーロッパ、日本でもいくつかシステムバイオロジー学科というところができるようになってきました。このころから私も体内時計を一つのモデル系にして生命システムをどうやって理解するのかに取り組んできました。2000年ころからゲノムの情報やそれに基づく計測法を駆使して最初取り組んだ研究が、時計によって操られる時計遺伝子を一網打尽にしようというプロジェクトでした (Ueda et al. Nature, 2002)。

#### (2) 体内時計が振動するメカニズム

体内時計の分野でも、ゲノム情報を元に体内時計を構成する時計遺伝子を全部見つけようという動きが急速に進みました。私たちが研究を進める中で、まず朝に作られる朝遺伝子

や昼に作られる昼遺伝子、夕方、夜、深夜、明け方と様々な時刻に作られる遺伝子がたくさんあり一番多い時刻を並べると連続的である、ということが分かってきました。そして遺伝子の発現制御の仕組みを調べてみると、どうやら3つの仕組みが重要そうだと分かってきました。つまり、朝の遺伝子、昼下がりの遺伝子、夜の遺伝子、この3つをつくる仕組みがどうやら重要で、この三要素を組み合わせると中間的な時間も作れそう、逆にいえば、その3要素である程度様々な「時刻」を作る仕組みは説明できそう、ということが分かってきました。だいたい2005年ぐらいまでにこの3つの仕組み（少なくともその一端）を明らかにできたので、その後、その間の関係を書いていくことに挑戦していきました。

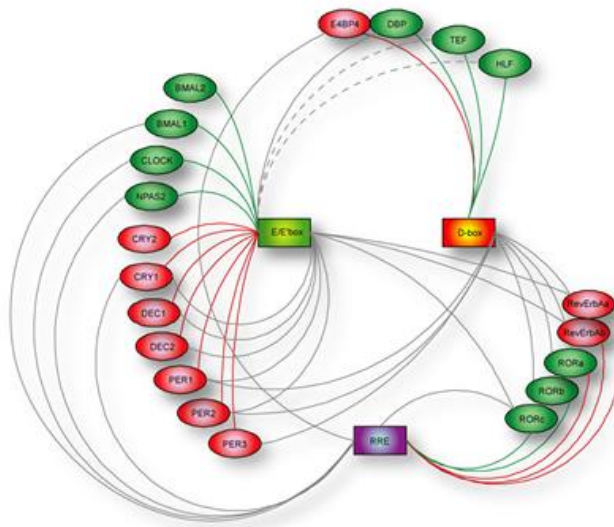


図1. 時計遺伝子の転写ネットワーク。3つの基本的なスイッチ(E-box、D-box、RRE)があり、緑色の時計遺伝子は発現を促進し、赤色の時計遺伝子は発現を抑制する。E-box は「朝」、D-box は「昼」、RRE は「夜」をつくることに重要である。

分かってきたことは、①まず朝遺伝子が昼遺伝子を ON にし、②昼遺伝子が夜遺伝子を ON にし、③夜遺伝子が朝遺伝子を OFF にする、という関係があるということです。この仕組みのことを「遅れを持った負の (=ネガティブ) フィードバック」といいます。まず、朝・昼・夜と進んでまた朝に帰ってくるという意味で、フィードバックといいますが (対になる言葉にフィードフォワードがあります)。いま、朝遺伝子が昼遺伝子を ON にし、昼遺伝子は夜遺伝子を ON にして、夜が朝を OFF にしますので、朝から活性化が進んでいくのですが、一回りすると最終的には自分を押し戻す方向になります。つまり自分自身に負の影響を及ぼすので、これを負のフィードバックと言います。しかも朝→昼→夜→朝と少し時間がかかるので「遅れ」が生じます。なのでこういう仕組みを「遅れを持った負のフィードバック」と言います。これがなぜ振動を作り出すかと言うと、ある影響が時間を経て自分に

帰ってくるためです。これはマイクのハウリングと同じ原理です。自分が活性化した影響が、今度、自分を押し戻す方向で帰ってくると自然と振動がおきるのです。こういう仕組みが、私たち人間や動物の朝・昼・夜遺伝子の間にどうやらありそうだとということが、長い研究の中で見えてきました (Ueda et al., Nat Genet, 2005)。

これですべて説明できればシンプルでいいのですが、実はもう1パターンありそうということも分かってきました。このパターンでは情報は「逆周り」になります。朝が夜を OFF にして、夜が昼を OFF にして、昼が朝を OFF にする、こういう関係がありそうだというわけです。一見先ほどよりも複雑ですが、先ほどの朝、昼、夜の順番で最終的に夜から朝を押し戻すという仕組みと、2番目の朝、夜、昼でまた朝に帰ってくる、ただし全てが押し戻すという仕組みは、実はどちらも似たような構造を持っています。1番目と2番目がなぜ似ているかと言うことですが、2番目のものも、朝からでた影響がまた朝に戻って来るといことでフィードバックになります。しかも、押し戻すというのが奇数個(3個)あります。2個あると、敵の敵は味方というようにキャンセルします。しかし奇数個あると、最後のひとつが自分に帰ってくる時は押し戻す、つまり負の影響が戻ってきますので、このパターンは負のフィードバックです。しかも、夜、昼と戻していくのでやはり遅れがあり、これも遅れを持った負のフィードバックの一類型です。どうやらこのように、私たちヒトを含む動物の時計細胞の中には2つの「遅れを持った負のフィードバック」が重なった構造があるという全体像が見えてきました。

こういう「遅れのある負のフィードバック」という原理が働いているならば、次のような予想が成り立ちます。①遅れが少なくなると振動は減衰し、②遅れを大きくすると、周期が伸びるだろう。そこで、実際に時計細胞を使って試してみたところ、予想した通りの結果を得ることができました。この研究結果は2011年に報告しています (Ukai-Tadenuma et al., Cell, 2011)。

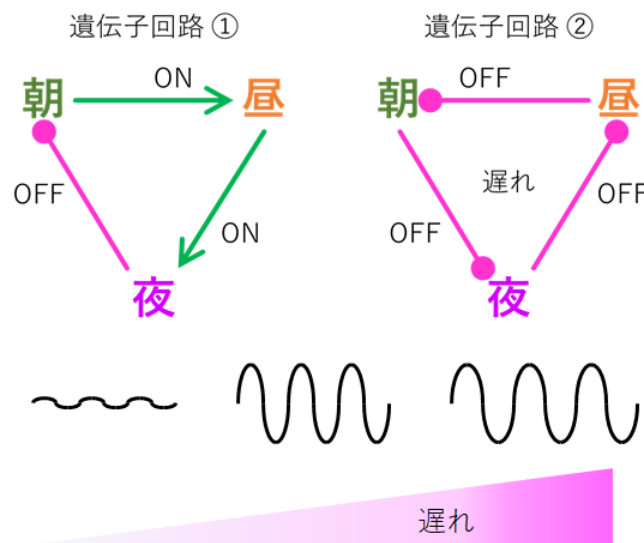


図2. 2つの遅れを持ったフィードバック。回路①は朝遺伝子の活性が昼に伝わり、夜に伝わって最終的に自分自身に「負」の影響を返す。回路②は朝遺伝子の活性は夜遺伝子を抑え、夜遺伝子は昼遺伝子を抑え、昼遺伝子は朝遺伝子を抑える。「遅れ」の減少は振動を減衰し、「遅れ」の増大は周期を延長させる。

### (3) 温度補償性の謎に迫る

これまでお話してきた遅れのある負のフィードバックに基づくモデルは、概念的に非常に分かりやすく、発振も説明でき、朝遺伝子・昼遺伝子・夜遺伝子間の関係も説明でき、と大変よいモデルなのですが、問題が残りました。このモデルは「物が作られ物が壊される」という仕組みに依る訳なのですが、物（分子）を作るという反応と、物（分子）を壊すという反応は、一般にどちらも温度に非常に感受性が高い反応です。つまり、温度が高くなると物は速く作られ、低くなると遅く作られるようになり、温度が高くなると物は速く壊され、低くなると遅く分解されるようになります。一般的に、全ての酵素反応は温度に依存していて、温度が10°C高くなると2倍から3倍くらいに速く、温度が10°C低くなると1/2倍から1/3倍くらいに遅くなると言われています。ですから、このモデルだと、体内時計の大事な性質である温度補償性（温度が変わっても時間の進みは一定）がうまく説明できないだろう、ということになります。

私たちは2005年には、朝・昼・晩の遺伝子を見つけそれが時刻を刻む機構の一端を見つけ、全貌が見え始めてきたという状況にありました（Ueda et al., Nat Genet, 2005）。しかしどうしてもこの「温度補償性」だけは説明できずに悩んでしまいました。そこで私たちは、もう一度基本に立ち返り、「時間」はどのように決まるのかという問題を考え直してみることになりました。この謎をとくためには、「時間」を決めている本当の仕組みを見つけてないといけないだろうと考えました。

そこでまず解明に取り組んだのが、1日の長さ（周期長）を決める仕組みです。もし周期長を大きく変えるやり方がわかれば、そこから周期決定の仕組みがわかるんじゃないかと考えて、時計細胞の遺伝子の発現量を変えるなどいろいろな工夫を試していきました。最終的には、ある化合物によって周期を大きく変えることに成功しました。名古屋大学の近藤孝男先生の協力によって特別な装置を作り、384個の穴が開いたプレートの中に、体内時計の様子がホタルの光でわかるように工夫した時計細胞を生やし、様々な化合物を1つずつ加えていきました。そしてそれぞれの細胞の発光のパターンを調べたら、ある化合物を加えた場合には24時間周期でも、他の化合物ではちょっと違う（周期長が変わる）ということがわかってきました。面白いことに、ある化合物を加えた場合には、1日の長さが24時間の倍の48時間にまで延長してしまいました。こういう周期長を伸ばすような化合物が10個くらいあったのですが、その性質を調べてみると、最終的に全部、朝物質のタンパク質に印をつける（リン酸化する）タンパク質（酵素）の役割を変えるものでした。

さて、酵素の働きが1日の長さを決めていることが分かってきたのですが、酵素反応は温

度に依存するはずです。酵素が1日の長さを決めていること自体は間違いないのですが、もしこの酵素反応が通常のように温度に鋭敏であるならば、温度が10°C変わると約2~3倍速く反応が進んでしまいますから、単純に考えれば10°C下がれば体内時計の1日の長さは半分か1/3になってしまうということになります。不思議に思って、この酵素を試験管の中に取り出して、時計タンパク質（の一部）をこの酵素に分解させて、その反応を見てみました。普通の酵素の場合には、25°Cで実験した場合と35°Cで実験した場合のスピードは2倍から3倍に変わることがほとんどです。しかし実際に測ってみると、この見つけてきた酵素は、なんと温度が25°Cから35°Cに変わっても（さらに15°Cから45°Cの範囲では）ほとんど分解速度が変わらないということが分かりました。つまり、温度に依存しない特別なタイプの酵素だったのです。どうやら時間を決める仕組みというのは何か「印」をつけていくような酵素が決めていて、しかもその酵素というのは温度にほとんど依存しないという特別なタイプの分子だったということでした (Isojima et al., PNAS, 2009)。

#### (4) 「質」が決める時間

私たちはこの結果から、どうやらもしかしたら時間は「量」で決まっているのではないのではないかと考え始めました。そうではなくて、タンパク質に何か「印をつける」（質を変える）ことで時間が書き込まれているのかもしれない、と考えたのです。こういう温度変化に非常に強い酵素が存在することから、こういう酵素が「印を付けたり外したり」することが、「時間が進んだり時間が戻ったり」する現象に対応するのではないかと考えました。

時間を「質」の変化で表す場合には、時間が進むこと、時間が戻ることを直感的に理解することは難しいかもしれません。時計タンパク質に「印をつける・印を外す」を一回りとすれば、印をつける相手（基質）が1つでも酵素が2つあれば一回りできることになります。このことを理解するのに、自動車レース、F1のレースがヒントを与えてくれます。例えばF1カーがサーキットを走っていくとします。F1カーがサーキットを回ってもう一度最初のところに戻ってくる、戻ったときに印がついてまた外れて戻ってくる、とこういうことを考える。ただしF1カーがランダムに走ってしまうと全体はバラバラになってしまうので、毎回みんな同じスタートラインに並び直させます。言い換えると、ある時計タンパク質（F1カー）がリン酸化されたら（印がついたら）その状態で他の時計タンパク質がリン酸化されるまで少し待っているという仕組みを考えます。そしてもう一度皆が揃うとまた状態を変えて行く。先にゴールラインに着いた時計タンパク質は他の時計タンパク質の「印」が同じ状態になるまでちょっと待っている、こうした仕組みであれば、理論的には、たった1分子の状態が変わるだけで時計を作ることができそうです。どうやらこれが、新しいタイプの時間の作り方の候補になりそうです (Jolley et al., Cell Rep, 2012)。

① 1方向への反応サイクル  
(例：リン酸化状態サイクル)



1分子振動子

②同期の仕組み  
(例：酵素トラップ)



振動子の同期

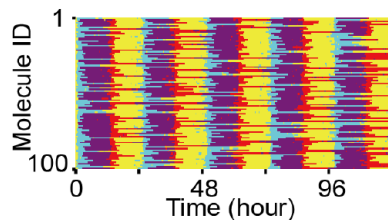


図3.「質」で時を刻む仕組み。1分子がある状態をとったり元に戻ったりすることで時が進むことを表すことができる。例えばリン酸化状態と脱リン酸化状態とで時の進みを表す、という考え方である。振動子の同期は、例えばその状態をとるのに必要な酵素によって達成される。

これまでみてきたように、分子の量で時間を刻むという考え方（回路で時間を刻む）と1つの分子の状態で時間を刻むという考え方（素子で時間を刻む）、二つの異なる考え方があります。「遅れのあるフィードバック」に基づいて時間を刻むという考え方は、直感的にも理解しやすく、ノーベル賞が授与されたぐらい世界的に広く認められています。しかしながら、温度補償性という体内時計の重要な性質からもう一度見つめ直すと、どうやらこれとは違う考え方が必要そうだ、というところに行き着きます。後者の「素子の状態で時間が決まる」という考え方はなかなか理解や実際の測定が困難なのが難点ですが、一方で温度変化に非常に強い性質を持っているのが利点です。簡単な例えをつかって言い換えますと、私たちの体の時間が、お風呂に水が溜まっていくように計測されているのか、分子の印が変わっていく（あるいは紙に物が書かれて消しゴムで消されてという）ような形で数えられているのか、という問題でした。体内時計のもつ重要な性質（温度補償性）を説明しようとする、紙に物を書いて消して、というような時間の数え方が自然に出てくる、という話でした。