キイロショウジョウバエの概日温度適応

梅 崎 勇次郎¹・吉 井 大 志²

変温動物である昆虫にとって、周囲の温度変化は、個体の生命活動に大きな影響を与える重要な環境因子である。例えば、低温下では活動が低下し、それが長期に続けば死に至る。高温は、さらに危険であり、短時間で死に至ってしまうこともある。昆虫が生息する多くの環境では、周囲の温度は一日の中で変化する。そこで昆虫は、一日の時間を測る時計“概日時計”を使って、24時間周期の温度変化をあらかじめ予測することで、環境にうまく適応している。動物の概日時計の研究は、1990年代以降、特にキイロショウジョウバエとマウスを用いた遺伝学的・分子生物学的な研究により急激に発展し、時間を測る分子機構の中心的部分がすでに解明されている。特にショウジョウバエでは、概日時計を構成する神経細胞（時計細胞）の同定、またその時計細胞を遺伝学的に操作する技術も発達しており、様々な研究手法を用いることが可能になっている。そのような背景を基に、著者らを含むいくつかの研究グループは、キイロショウジョウバエを用いて概日時計と温度適応について研究を進めてきた。本総説では、概日時計が周期的な温度変化に同調するという、概日時計の制御によって温度選択的に概日リズムが生まれること、の2点についてこれまでの研究を概説する。

1. キイロショウジョウバエの概日時計

一日（24時間）を測る体内時計－概日時計－は、シアノバクテリアからヒトまでの非常に多くの生物種で発見されている¹²⁾。概日時計が進化的に非常に良く保存されていることはすなわち、地球上の昼夜の環境変化に適応することが、多くの生物にとって非常に重要であることを示している。例えば植物においては、効率良く光合成を行うことや乾燥や強光ストレスに対応するために、あらかじめ朝の時間を予測できることは、予測できない植物よりも有利であろう。植物の陸上進出の際には、そのように太陽光による、紫外線・熱に適応するために概日時計が重要な働きをしたと想像できるが、地上の生態環境が複雑化するに伴って、被食者－捕食者間のリズムなど生態全体に概日リズムが形成されていったと考えられる。従って、概日時計を持つ意義を理解するには、その生物種の生活様式を知る必要があるだろう。

概日時計の生態的意義を明らかにする研究対象としては、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は非常に退屈な動物である。ハチやアリのように高度な行動

も示さないし、寿命も比較的短く、休眠なども基本的には行わない（系統によっては行う）。体長も3 mm程度と小さく、多くの人に好まれる昆虫とは言えない。しかしながら、遺伝学においては卓越した実験モデルであり、ショウジョウバエを用いた研究に対して、すでに3回のノーベル賞受賞がある。ショウジョウバエを研究に用いる利点として、飼育が容易であること、多産であること、約10日で世代交代できること、などがある。その中でも、最も重要な点は、染色体の数が少なくゲノムサイズが小さいことと、遺伝子の重複が少ないことが挙げられる。前者については研究者の努力と費やす時間によって克服可能であるが、後者はその生物固有のものであり、遺伝学を行う上で非常に重要な要素である。

1971年にKonopkaとBenzerは、キイロショウジョウバエを用いてX染色体上の遺伝子 *period* (*per*) の突然変異体を3系統単離し、点変異が起こった場所によって、歩行活動リズムがなくなる (*per⁰* 変異体)、リズムの周期が短くなる (*per^s* 変異体) もしくは長くなる (*per^l* 変異体) ことを報告した⁴¹⁾ (図1)。行動遺伝学においてこの発見は、生得的行動が特定の遺伝子によって実際に制御されていることを証明した初期の研究として高く評価されている。一方で、時間生物学においては、特定の遺伝子が概日リズムの周期を長くしたり、短くしたりすることに関与するということは驚きであった。ちなみに、*per⁰* 変異体は *per* 遺伝子の途中で終止コドンが入ることで、ナンセンス変異となる^{5, 84)}。一方、*per^s* 変異体はPERタンパク質のリン酸化部位に変異が入っており、リン酸化状態の促進が起こっている¹³⁾。また、*per^l* はパートナータンパク質との結合ドメインの近くに変異があり、核に移行し難くなっていると考えられているが、その詳細は未だ明らかになっていない¹⁹⁾。

2. ショウジョウバエ概日時計の分子モデル

DNAシーケンシング技術の発展もあり *per* 遺伝子の発見から十数年後、1984－1986年に *per* 遺伝子のクローニングが成功する^{4, 37, 86)}。配列の決定によって、ノーザンブロット法やRNaseプロテクション法などmRNA発現量を測ることが可能になった。1990年にHardinらは *per* mRNAの発現量に周期的なリズムがあることを証明し、その背後には *per* 自身による負のフィードバックループが存在し、それが時計の分子メカニズムであることを提唱した²⁷⁾。

¹Yujiro UMEZAKI, ²Taishi YOSHII, ¹Visual Systems Group, Abrahamson Pediatric Eye Institute, Division of Pediatric Ophthalmology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center (3333 Burnet Ave. Cincinnati, OH, USA 45229), ²岡山大学大学院自然科学研究科時間生物学研究室 (〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中三丁目1-1 岡山大学大学院自然科学研究科)
Received 13 June Accepted 21 July

図1 *per* 突然変異体の活動リズム 初めの4日間は明暗12時間：12時間 (LD) のサイクル下で活動リズムを計測し、その後、光を完全に消した恒暗条件 (DD) にした。温度は20度一定であり、外界の光環境からは完全に遮断されている。活動リズムはアクトグラムで示しており、一つの横線が一日の時間経過を示し、活動は縦線で表している。一日経つごとに、下の横線に移動していく。さらに、活動リズムの推移を見やすくするために、一つのアクトグラムを一日分だけずらして横に並べた、ダブルプロットアクトグラムにしている。それぞれの活動リズムはそれぞれのショウジョウバエ系統の代表的な活動リズムを示している。アクトグラム上の長方形は、LDにおける光条件 (明期が白、暗期が黒) を示している。ZT (Zeitgeber time), 概日因子時刻。野生型のは、DD移行後、約24時間周期で活動リズムが自由継続するが、*per*⁰ 変異体ではリズムが消失し、*per*^S 変異体では約19時間の短周期のリズム、*per*^L 変異体では約27時間の長周期のリズムになっていることが分かる。

1990年代は、ショウジョウバエ概日時計の研究が爆発的に発展した。まず、1994年の *timeless (tim)* 遺伝子の発見により、*per* だけが“時計遺伝子”ではないことが明らかになった⁶¹⁾。また1998年には、*per* と *tim* の転写を制御する *Clock (Clk)* と *cycle (cyc)* 遺伝子が発見され、*per* のフィードバックループを構成する主要因子が出そろった^{2,58)}。1990年代には、シアノバクテリアとアカパンカビでも転写・翻訳フィードバックループが時計のメカニズムであること、また1990年代後半からはショウジョウバエ時計遺伝子のマウスホモログの多くが概日時計に関与することが示され、概日時計の分子メカニズムが昆虫と哺乳類で良く保存されていることが明らかになった¹²⁾。それ以降は、PER や TIM タンパク質を修飾する酵素の発見、*Clk* 遺伝子の転写制御を行う *PAR domain protein 1 (pdp1)* 遺伝子と *vri* (*vrille*)

遺伝子の発見など、フィードバックループを構成するその他の因子が明らかになっていき、分子機構の全体像が見えつつある⁶⁷⁾ (図2)。

図2 概日時計の分子メカニズム 日中、CRY タンパク質は、青色光を受容することにより活性化しTIMを分解に導く。従って、TIMは日中細胞質に蓄積することができないことから、PERとの二量体形成も夜に限定される。さらに、高温ではCaM タンパク質がTIMを分解に導く。これも日中のTIMの蓄積を抑制していると想定されているが、詳細は不明である。日暮れから夜にかけてCLKとCYC時計タンパク質はヘテロ二量体を形成し、PER、TIM、PDP1、VRI、CWO時計タンパク質をコードする遺伝子の転写を活性化させる。夜の半ばから後半にかけてPER、TIMの発現レベルはピークを示し、夜明け前になるとPERとTIMはヘテロ二量体を形成し、CLK/CYCの活性を強く抑制することで、負のフィードバックループを形成する。またCWOもCLK/CYCの活性を補助的に抑制している。また、夜のはじめから半ばにはVRIが*Clk* 遺伝子の転写を抑制し、夜の半ばから後半にはPDP1が逆に活性化している。これにより、VRI/PDP1は*Clk* 遺伝子の転写を介したフィードバックループを形成している。これらのフィードバックループが約24時間で回ること、*cyc* 遺伝子を除く時計遺伝子と時計タンパク質の発現量に約24時間の周期性が生まれる。

現在、概日フィードバックループは次のように説明されている。昼の後半にCLK/CYC タンパク質二量体が、*per*, *tim*, *vri*, *pdp1* 遺伝子の転写を活性化させ、それぞれの産物タンパク質は夜に細胞質内に蓄積していく。PERとTIMは二量体を形成することで、核に移行することが可能になり、PER/TIM二量体は夜の後半から朝にかけてCLK/CYCの転写活性を抑制する。これにより、PER/TIMは自身の転写を抑制する負のフィードバックループを形成する。一方、VRI, PDP1は、PERとTIMと同様に、夜の後半に蓄積するが、単独で核内に移行することができ、VRIタンパク質は*Clk*の転写を抑制し、PDP1は*Clk*の転写を活性化させる。細胞内においてVRIタンパク質の方が、PDP1よりも早く蓄積することで、夜間には*Clk*の発現は抑制され、その後、夜の後半から朝にかけて*Clk*の発現量は増加する。従って、VRI/PDP1は、*Clk*の発現量を周期的に制御することで、二つ目のループを形成することになる。この二つ目のループは、より正確に24時間を測るために重要である。さらに、それらのループとは独立して単独で負のフィードバックループを形成する遺伝子*Clockwork orange (cwo)* 遺伝子があり、*per/tim*と同様に、直接的に自身の転写を抑制している^{38, 45, 48}。この3つ目のループは、時計遺伝子の発現リズムの振幅を調節することで、リズムの頑強性を生み出しているとされている。ここでは詳しい説明を割愛させていただくが、それぞれの時計タンパク質は、リン酸化などの修飾を受けて、そのタンパク質が細胞内に蓄積する時間などが調節されている。

1971年に発表された*per* 遺伝子の発見から約30年、なぜ*per* 遺伝子の機能欠損により概日時計が止まるかを説明することができた。一つの遺伝子によって制御されていると考えられた概日時計であったが、フタを開けてみると非常に多くの遺伝子に関わる複雑なものであった。比較的新しく見つかった時計遺伝子*vri*, *pdp1*, *cwo*や時計タンパク質を修飾する酵素などはすべて致死遺伝子であり、2000年代では、致死遺伝子の機能解析が大きな課題となっている。また、他の生物では転写・翻訳フィードバックループとは別の振動機構も明らかになっていることから、ショウジョウバエでも再検討していかなければならない課題も存在する。

3. 概日時計の所在

1960-70年代に、ゴキブリやコオロギを用いた研究より、行動リズムを制御する中枢時計は脳の視葉に存在することが明らかになっていた⁵³。同時期に、哺乳類や鳥類でも同様に脳に時計があることが確認された¹⁸。これらの研究は、外科的手術により脳の一部を切除、また移植することで行動リズムにどのような影響が現れるかを調べたものであり、とてもショウジョウバエでは行うことができない。そのため、ショウジョウバエでは長らく時計突然変異体は存在しても、時計の場所を特定することはできなかった。

ショウジョウバエの中枢時計細胞の同定に大きく貢献したのは、Pigment-dispersing factor (PDF) 神経ペプチドの発見である²⁹。PDFはPERが発現する脳神経細胞の一部で発現しており、*pdp* 遺伝子の突然変異体では恒暗条件下で歩行活動リズムが非常に弱くなり、その弱いリズムは約22時間の周期であることが明らかにされた⁵⁴。従って、PDFを発現するPER陽性細胞(s-LNVとl-LNV)は、概日

行動リズムの制御に非常に重要であり、PDFが概日時計の出力物質であることが考えられた(図3)。その後、PDF受容体が同定され、受容体はPDF陰性時計細胞で発現していることが明らかにされた。つまり、PDFは複数ある時計細胞間を結ぶ神経伝達物質であることがわかった^{35, 36, 62}。

1993年にショウジョウバエでは、部位特異的に遺伝子発現を可能にするGAL4-UASシステムが開発され、1990年代の後半からは、概日時計の研究にも盛んに応用され始める。例えば、緑色蛍光タンパク質GFPを*per*発現細胞もしくは*tim*発現細胞に発現させる*per-GAL4/UAS-GFP*と*tim-GAL4/UAS-GFP*により、脳のどの神経細胞に*per*と*tim*が発現するのかを正確にマッピングすることができた⁴⁰。その結果、約150個の神経細胞で*per*と*tim*が周期的に発現することが同定され、時計機構を保持する細胞として“時計細胞”と呼ばれるようになった。それらの神経細胞は、9つのクラスターを形成し、細胞体の位置、細胞体の大きさ、発現する神経伝達物質などにより分類されている(図3)。また、2004年には、GAL4-UASシステムを用いて特定の時計細胞群にのみ時計機能を回復させる実験が行われ、s-LNV時計細胞は朝の活動を、LNdと5th s-LNV時計細胞は夕方活動を制御することが報告された^{23, 65}。つまり、150個ある時計細胞は細胞群クラスターごとに別の役割を持つ可能性が示された。

最近では、PDF以外の時計細胞の出力因子の研究が進んでおり、グルタミン酸、アセチルコリンや、Neuropeptide F, small neuropeptide F, ion transport peptide (ITP), Diuretic hormone 31 (DH31)などの神経ペプチドが様々

図3 脳内の時計細胞地図 (A) *Clk856-GAL4/UAS-GFP* システムを用いて、*Clk* 遺伝子の発現細胞にGFPタンパク質(緑色蛍光タンパク質)を発現させて、それを抗GFP抗体で免疫染色した。ショウジョウバエの脳の左半球を中心に共焦点レーザー顕微鏡で染色画像を取得している。*Clk* 遺伝子は脳内で時計細胞以外でも発現していることから、染色されている細胞のすべてが時計細胞というわけではない。(B) 脳内の時計細胞群の位置。時計細胞群は細胞の位置や大きさなどで9つの群に分類されている。s-LNV (small ventral lateral neuron) とl-LNV (large ventral lateral neuron) とよばれる細胞群は、PDF神経ペプチドを出力因子として発現しており、全時計細胞の中でも特に重要だと考えられている。その他、5th s-LNVとLNd (dorsal lateral neuron) 時計細胞群は、夕方を制御する細胞群であるとされ、光同調に関与していると考えられている。近年は、DN (dorsal neuron) 細胞群の研究が比較的盛んに行われている。

な時計細胞群で発現していることがわかっている⁵⁰⁾。その中で、機能解析が行われているのが、DN1細胞群から出力されるグルタミン酸^{9, 25)}、また同じDN1細胞群から出力されるDH31⁴²⁾、5th s-LNvとLNdから出力されるITP³²⁾、s-LNvからPDFと共に出力されるグリシン¹⁶⁾であり、概日時計の出力もしくは睡眠に関与することが報告されている。しかしながら、PDFの研究と比べると論文数も少なく、さらなる研究の蓄積が求められている(表1)。

表1 各時計細胞群におけるCRYと神経伝達物質の発現

時計細胞(細胞数)	CRY	神経伝達物質(細胞数)
s-LNv (4)	○	PDF, sNPF, グリシン
l-LNv (5)	○	PDF, NPF (3)
5 th s-LNv (1)	○	ITP, NPF, アセチルコリン
LNd (6)	△	ITP (1), NPF (3), sNPF (2), アセチルコリン (2)
DN1a (2)	○	IPNamide, グルタミン酸
DN1p (15)	△	グルタミン酸 (6), DH31 (6)
DN2 (2)	—	
DN3 (~30)	—	グルタミン酸 (~10)
LPN (3)	—	

1. ○, —は、全ての細胞がCRY 陽性、陰性であることをそれぞれ示す。△はCRY 陽性と陰性の両方を含む。
2. 神経伝達物質の後のカッコ内の数字は、各時計細胞群内でその物質を発現する細胞数を示す。
3. Neuropeptide F (NPF), Small neuropeptide F (sNPF)

4. 概日時計の光同調メカニズム

多くの生物の概日時計にとって最も重要な環境同調因子は光である。地球の自転によって作られる24時間周期の光サイクルは、一日の時刻を知るのに最も適している。そこで概日時計は、常に光サイクルに同調することで、日々の時計のずれをリセットしている。本総説の主題は温度であるが、深く関連する事項であるので、概説しておく。

概日時計の光入力経路は、眼からの入力経路か、脳内に存在する光受容体で直接光を受容する経路かに分かれる。哺乳類やゴキブリ、コオロギなどは眼からの光入力が必要であり^{11, 15, 57)}、一方、鳥類や爬虫類では種によって異なるが、眼からの入力経路と脳の松果体で光を受容する経路がある。ショウジョウバエでは、青色光受容タンパク質 Cryptochrome (CRY) を用いて、時計細胞で直接光を受け取る経路と、複眼などの外部光受容器の介した経路の二つを同時に用いている⁷⁷⁾。特に、CRYの光入力経路は非常に良く研究が進んでいる。光によって活性化されたCRYは、時計タンパク質 TIM に結合し、TIMの分解を促す⁷⁾。これにより、日中はCRYによってTIMが分解されることから、そのパートナーであるPERは蓄積することができない。従って、必ず夜にしかPER/TIMの二量体は形成されないように制御されている。この光入力システムは非常に感度が高く、8時間の時差ぼけを起こす実験を行っても、二日後にはほぼ完全に時差ぼけから回復することができる^{14, 78)}。それに比べて、眼からの光入力経路は、それほど早く概日時計をリセットできないので、*cry* 突然変異体(眼からしか

光入力ができない)は時差ぼけの回復に約6日間以上を要する。

基本的にCRYによる光入力経路は、素早く概日フィードバックループに作用することができるので、非常に早く光リセットを行うことができる利点がある。しかし、夜明けと日暮れの緩やかな光照度の変化を読み取ることは難しい。一方、眼(主に複眼)からの光入力は、CRYがあまり活性化しない弱い光にも応答することが可能であり、概日リズムの微調整には重要な働きをする^{31, 56)}。例えば、野生型のハエは長日・短日など日長に合わせて、活動リズムが変化するが、眼を持たない*glass* 突然変異体は、長日でも短日でも活動リズムにあまり変化がない。つまり、眼からの光入力は、日長を読むことに関与している。

ショウジョウバエは、明暗サイクル下で朝と夕方に活動が高まる。逆に、昼と夜には活動が低下し、睡眠時間が増える。恐らく、これは昼の高温期と夜の低温期に活動することを避けるためであると考えられる³⁰⁾。従って、長日(夏)では温度が一定であっても昼の活動休止期は長くなり、短日(冬)では朝方と夕方の活動がそれぞれ真昼側にシフトしてくる。この活動リズムの長日・短日適応は、日長を一定にして、温度のレベルを変化させても同様に起こる⁴⁷⁾。このことから、温度適応を行うために、ショウジョウバエの概日時計は日長と温度を入力し、行動リズムを変化させていることがわかる⁶⁹⁾。

5. 概日時計の温度同調性

一般的に、温度は概日時計をリセットする2番目の同調因子であると言われている。太陽光によって暖められる地上の温度も、一日周期で明瞭な変化を示すことから、概日時計にとっては一日の時刻を知るための良い時間情報である。特に、爬虫類、魚類、昆虫などの変温動物(外温動物)では、概日時計が温度サイクルに同調することが多く報告がされている⁵⁵⁾。一方で、哺乳類のような恒温動物の概日時計は、温度サイクルにあまり応答しない。

ショウジョウバエで概日時計の温度同調を初めて体系的に研究したのは富岡らによる1998年の論文である⁶⁹⁾。30度:25度、12時間:12時間の温度サイクルを与えた場合、ショウジョウバエの歩行活動リズムはそれに同調することができる(図4)。この実験は光環境が一定の恒明条件、恒暗条件で行っているのだが、非常に興味深いことに、恒明条件下でも温度サイクルに同調した歩行活動リズムが見られる⁸¹⁾。ショウジョウバエは通常、恒明条件下で概日リズムが無周期になってしまう。そのメカニズムは、先ほど述べた光により活性化されたCRYがTIMを分解に導き、時計のフィードバックループを停止させてしまうことで説明されている。

実際に、恒明条件下で温度サイクルをショウジョウバエに与えた場合、TIMは、通常より低いレベルではあるが、夜(25度)と昼(30度)で増減する発現リズムを示す。つまり、何らかのメカニズムによって、温度サイクル下(特に低温期)では光によるTIMの分解が抑制され、恒明下であってもフィードバックループが回ることが可能になると考えられる。そこで、著者らは、恒明条件下で、ショウジョウバエに温度の変化を一度だけ与える実験を行った⁷⁶⁾。より明瞭な影響を得るために、温度の変化は30度と20度の

図4 温度周期下における活動リズム (A) 温度のピークが26度、最も低い温度が16度の野外の温度変化を模した温度サイクル下での野生型ショウジョウバエ27匹の平均活動リズム。活動リズム計測の開始から7日目に、温度サイクルの位相を6時間後退させると、それに合わせて温度サイクルに再同調するリズムが見られる。また、その10日後に6時間の位相前進を行うと、またそれに再同調する。(B) 温度26度12時間：16度12時間の一般的なインキュベーターで作ることができる温度サイクル下での、野生型ショウジョウバエ25匹の平均活動リズム。Aと同様に、温度サイクルの6時間の位相前進、位相後退を行い、活動リズムが温度サイクルに再同調することを示している。この単純な温度サイクルでは、16度から26度の温度の切替りに大きな活動量の増加が見られ、これは概日時計による活動ではなく、急激な温度変化に対する直接反応である。ZT (Zeitgeber time), 概日因子時刻。文献 (84) からの改変。

10度差にし、恒明下で30度から20度への温度の低下、もしくは20度から30度への温度の上昇を行った。温度の一時的な上昇後、すぐに *Clk* mRNA の発現量が上昇し、一方、温度の低下後は *per*, *vri*, *pdp1* の発現が上昇した (図5)。つまり、温度の上昇と低下はそれぞれ別々の時計遺伝子の発現に影響を与える。温度サイクルは、温度の上昇と低下を24時間サイクルで繰り返すことであるから、温度サイクルによって、常に時計遺伝子の発現にリズムが生まれ、時計が停止する恒明条件下であっても概日リズムが生まれたと考えることができる。

6. 光の時計と温度の時計

2000年代に入ると、免疫染色で安定した結果が出せる良い抗時計タンパク質抗体が作られたことと、蛍光免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡の普及などにより、脳内中枢時計細胞における時計タンパク質発現量を、比較的定量性がある形で可視化することが可能になってきた⁶³⁾。ショウジョウバエの脳は厚さが約200 μ m程度であることから、共焦点レーザー顕微鏡ではホルマウントで一気にスキャンできる利点がある。明暗サイクル下では、ほぼすべての中枢時計細胞でPERやTIMの発現量が夜高く、昼低いリズムを示す。一方で、恒暗条件下ではいくつかの時計細胞はそのリズムを失うことが分かっている。つまり、光サイクルによってドライブされる時計細胞と、自律的にリズムを生み出す時計細胞の二種類があると考えられる。恒明条件下で温度サイクルを与えた場合には、明暗サイクル時と同様にほぼすべての時計細胞がPERの発現リズムを示した⁸⁰⁾。興味深いことに、明暗サイクル下ではあまり明瞭なリズムを示さないLPNと呼ばれる細胞群が、温度サイクル下ではリズムを示すことが明らかになった。従って、LPNは温度サイクルによってドライブされる時計細胞であると考えられる。

宮迫らは光サイクルと温度サイクルの位相を6時間ずらして、どの時計細胞がどちらの環境サイクルに同調するか

図5 温度変化に対する時計遺伝子発現の変化 恒明条件下では、ショウジョウバエの概日時計は停止している。その条件下で、温度を一度だけ変化させ、時計遺伝子の発現をリアルタイムPCRで定量した。サンプルは、ハエ頭部を用いている。30度から20度の温度変化、もしくは20度から30度の温度変化を与えた場合、*per*, *vri*, *Clk* 時計遺伝子の発現量は大きく変化する。また、温度の上昇と、温度の降下では、それぞれ逆の反応を示す。このことから、時計遺伝子の発現は温度変化に大きく影響されることが分かる。それぞれのmRNA発現量は、明暗サイクルにおける遺伝子発現ピーク時のmRNA発現量を1として、相対的な量を示している。3回の独立した実験の平均 ($\pm$ 標準誤差) である。文献 (80) からの改変。

を調べた⁴⁹⁾。その結果、DN 時計細胞グループとLPNが温度サイクルにより同調するリズムを示し、LN グループは光サイクルに同調するリズムを示すことがわかった。その後、光同調に強く関与するCRYは、ほぼすべてのLN グループで発現し、DN グループの半数と、LPNでは発現していないことが明らかにされた(表1)⁸²⁾。このCRY 陰性 DN 時計細胞とLPN 時計細胞はやはり温度サイクルに強く同調を示すことから、光の時計細胞、温度の時計細胞はCRY 発現の有無で区別できるかもしれない⁷⁹⁾。これらの研究は、時計細胞の中には光と温度に対して同調性が異なる細胞が存在することを示しているが、それらの時計細胞が行動リズムの光・温度サイクル同調にどのように関与しているのかは依然として不明である。基本的に、光サイクルだけの場合、温度サイクルだけの場合でもほぼすべての時計細胞はPERやTIMの発現リズムを示すことから、ほぼすべての時計細胞は光サイクルにも温度サイクルにも同調可能である。別の研究において、DN1とDN2のみにテタヌス毒を発現させ神経伝達物質の放出を抑制した場合には、行動リズムの温度同調性に異常が出ることも報告されていることから、それらの時計細胞が重要な役割を持っていると考えられる⁸⁾。しかし、LN グループの一部であるs-LNvとl-LNvにだけ時計機能を回復させた場合にも不完全ではあるが温度サイクルに同調したリズムが生まれる⁶⁾。従って、特定の時計細胞が温度サイクル同調のすべてを担っているわけではないのだろう。

野外においては、通常光サイクルと温度サイクルが両方存在し、昼に温度が高くなり、夜には温度が低下していく⁸³⁾。恐らく、150個の時計細胞は、光と温度をそれぞれ入力し、時計細胞ネットワークの中で情報を統合しているのだろう。実際に、光サイクルのみをハエに与えた場合、温度サイクルのみの場合、光と温度サイクルの両方を与えた場合では、二つの環境因子がある方が、TIM 発現リズムの振幅が大きくなる⁸³⁾。このように、野外の複雑な環境変化にうまく適応するためには、役割が異なる時計細胞を混ぜることにより、柔軟性の高い時計機構を構築しているのかもしれない。

7. 温度同調の入力経路

実験室で温度サイクルを与える時には、インキュベーター内で高い温度を昼に、低い温度を夜に合わせて温度をコントロールすることが一般的である。例えば、30度と25度を12時間：12時間のサイクルで繰り返すといった感じである。しかし、25度：20度のサイクルでは、25度が昼に相当することから、概日時計が温度サイクルに同調するには、温度の絶対値を入力するというよりは、昼と夜の温度の差を感知すると考えたほうが、もっともらしいだろう。そのような意味では、後述の温度選択性テストで見つかる温度受容体がそのまま概日時計の温度入力に関係しているとは限らない。古典的に、昆虫の温度受容体として触角が挙げられるが、触角を切除してもショウジョウバエの概日時計は温度同調を行うことができる²⁰⁾。

2005年に、Glaserらは概日時計の温度同調に異常が起きる *no receptor potential A (norpA)* と *no circadian temperature entrainment (nocte)* 変異体を発見した²⁰⁾。*norpA*はホスホリパーゼCをコードしており、ショウジョウ

ウバエでは複眼で発現が見られ、光受容に関係していることが古くから知られていた。一方、*nocte*は機能未知の遺伝子であった。その後、同グループは*nocte*が体の多くの組織で発現しており、特に脚や触角にある弦音器官(chordotonal organ)で*nocte*の発現をRNA干渉法によって抑制した場合には、行動リズムの温度同調に異常が起きることを明らかにした⁶⁰⁾。また、NOCTEタンパク質と結合するIonotropic Receptor 25a (IR25a)の突然変異体も27度：25度の温度サイクルでは同調することができず、IR25aも弦音器官で働いていることが明らかになっているほか⁸⁾、弦音器官に局在する非選択的カチオンチャネル(Transient receptor potential; trp)のPyrexiaも温度同調に関与している報告がある⁷⁵⁾。従って、ショウジョウバエ概日時計の温度入力経路は、脚にある弦音器官であると考えられる(図6)。

温度同調に関わる陽イオンチャネルとしてのTrpA1も報告されている。TrpA1は時計細胞の一部で発現が確認できることから、時計細胞で直接働くと思定されている⁴⁴⁾。しかし、時計細胞でTrpA1は発現していないという報告もあり、どの経路で働いているかは再検討する必要がある。時計細胞で直接的にTrpA1が働くとしても、弦音器官を経て神経連絡によって時計細胞に伝えられるとしても、時計細胞内のCa²⁺濃度に影響を与えることが考えられる。そこで、Tatarogluらはカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリン(CaM)に着目し、時計タンパク質TIMのCaM結合サイトに変異を挿入し、温度変化に対する応答性を検討した⁶⁸⁾。TIMは20度から30度に移行した場合、1-2時間掛けて分解されるが、CaM結合領域に変異があるTIMは、30度を与えてもほとんど分解されなかった。またCaMをRNA干渉法で発現抑制した場合にも、温度依存的なTIMの分解は抑制された。つまり、TIMは高温で不安定化するが、その経路にはCaMが関与していることがわかる。TIMは光によって分解が促されるが、高温によっても分解が促進され、光分解の経路にはCRYが、高温分解経路にはCa²⁺/CaMが関与することとなる。これにより、光も温度もTIMを標的として時計の分子機構に影響を及ぼすことで、時計のリセットに関与するモデルが考えられる(図2)。この研究は培養細胞系とハエ全身を用いていることから、脳内時計細胞におけるメカニズムを明らかにしているわけではない。しかし、同様の機構が時計細胞内に存在するこ

図6 概日時計の温度受容器官 (A) 概日時計の温度入力経路として候補に挙げられている脚の弦音器官の位置。(B)脚を拡大した場合の、弦音器官の位置。文献(61)からの引用改変。

とも十分考えられる。

以上の研究から、少しずつ概日時計の温度入力経路が明らかにされている。しかし、野外における温度変化はインキュベーター内とは違い、より段階的に起こり、一日全体の温度変化を感知し、その時間構造を理解しなければ昼と夜を認識することは難しいだろう^{74, 83)}。これまで見つかった温度入力経路がどのようにして自然の温度変化を読み取っているのかを理解することは、今後の課題である。

8. ショウジョウバエの温度選択行動

環境から受け取る温度情報は、自身の概日時計を同調させるだけでなく、最適なパフォーマンスの状態を維持するために重要である。それが変温動物であればなおさらである。多くの変温動物は、体内に温度を一定に維持する機構を持っていないか、あるいはその寄与が小さいため、最適な温度を選択し、そして熱を外部から取り込むことにより体温を維持する。この行動は温度選択行動 (Temperature preference behavior) と呼ばれる^{46, 59, 85)}。温度選択行動により最適な温度を選択することは、活動期に体温を上昇させて活発な活動を可能にすることなど、最適なパフォーマンスを維持するだけでなく、多くの子孫を残すために産卵のための場所を選ぶ際にも重要である。周囲の環境が最適な温度と合致しない場合、例えば極端に高温あるいは低温の場合は最悪死に直結するので、より良い場所を探し求めなければならない。

野外では温度以外にも光や湿度など様々な要因が温度選択行動に影響するため、定量性のあるデータを取るのには比較的難しく、大きな生物でなければ直接詳細な温度変化を測定することができない。また、高性能のサーモグラフも使用できるが、小型動物や細かな体温変化の測定に不向きである。一方で実験室では、実験環境は一定に保つことができるが、体サイズの大きなものは飼育スペースなどの問題が出てくる。その点ショウジョウバエは項目1で挙げたように利点が多数あることから扱いやすいモデルであり、また実験室で定量性のあるデータを計測することが容易である。

ショウジョウバエは実際にどの温度を選択するのか？実

験室で温度選択行動を測定する際、金属板上に温度勾配を作り、その上にプラスチック製のカバーを設置した装置を用いる。以前は温度勾配を作成するため低温側に氷水、高温側にホットプレートか温水を利用して温度勾配を作っていたが、電流依存的に発熱温度を変化させることが出来るペルチェ素子を安価に手に入れることが可能となったため、現在のような装置に落ち着いた²¹⁾。実際、室温25度、湿度70%、800–1000Luxの照射下の部屋で18–32度の温度勾配を与えた装置内に成虫のハエを放つと、放した直後は散逸して局在するが、徐々にハエは好みの温度に移動し、30分後には25度付近に集まることが観察できる。ハエが選択する温度は、一般的に実験室で至適とされる温度とほぼ一致する。

野外では、様々な影響のもとで一定の温度が選択される。温度選択行動に影響を与える因子として、温度のほかに、光条件、湿度、食物、加齢、社会性昆虫であれば個体間の相互作用などがあげられる¹⁰⁾。その中でも光は概日リズムだけでなく温度選択行動においても強く影響する。Headらは、光による影響について検討した²⁸⁾。通常、温度選択行動を測定する際に照明を点灯して行すが、消灯した場合では点灯した場合と比べて温度が約1度低下することがわかった(図7)。著者らはこれをLight-dependent temperature preference (LDTP) と名付けた。LDTPは、ハエ成虫の歩行活動において光照射後に活動量が一時的に上昇するマスキング効果と類似している。このことから、光照射はマスキング効果における活動量の上昇と同様に、選択する温度を正に影響することがわかった。また、著者らはLDTPを制御する光受容器について検討した。ショウジョウバエの光受容器には、上述のように外部光受容器(複眼、単眼、幼虫単眼の痕跡であるHofbauer-Buchner eyelet (H-B eyelet))と、青色光受容タンパク質CRYが存在する⁵⁶⁾。解析の結果、外部光受容器あるいはCRYのみでは有意な温度変化は観察されず、LDTPには外部光受容器とCRYの両方が必要であることがわかった。この結果は、複眼がマスキング効果を示す歩行活動とは異なる⁵⁶⁾。おそらく次の項目で記すように、温度選択行動は概日時計の影響も強く受けるため、外部光受容器とCRYの両方の光入力が必要なのではないかと考えられる。

図7 温度選択行動の光照射による影響 ハエは各時間帯において消灯時より点灯時のほうが1度ほど有意に高い温度を示す。温度選択行動は日周性のリズムを示すため、ハエは各時間帯で異なる温度を選択し、光照射条件では朝方には約25度を、日暮れ前には26.5度付近を選択する。灰色のグラフはアッセイ時に光照射した場合、黒色のグラフは消灯した場合の結果を示す。各グラフのシンボル近くにある数字はアッセイを行った回数を表し、灰色のグラフのシンボルの上部にあるアスタリスクは消灯時と比較したt-testによる統計処理結果を示す。光照射条件 (WT-light) のデータでは、アッセイ毎の差が小さかったことから、エラーバーがほとんど見えない。**, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$. 文献 (28) より図を改変。

成虫の温度選択行動の制御において重要な役割をする温度受容体として、TrpA ファミリーに属するTrpA1が挙げられる。TrpA1は成虫の脳の3領域に局在し、そのうち触角から触角葉に伸びる触角神経 (Antennal nerve) 内に局在するAnterior cells (ACs) は成虫の温度選択行動において温センサーとして働く²⁴⁾。TrpA1の温度反応性について、TrpA1は24度以上で活性化を示し、詳細な解析から24–29度で活性化することが明らかにされている^{24,72)}。また、行動レベルではTrpA1の遺伝子挿入変異体 *TrpA1^{ins}* は温度勾配下で28度付近の温度選択行動を示す²⁴⁾。

概日リズムの温度同調では、1度以上の温度差を周期的に与えることで、温度サイクルに同調する⁷³⁾。しかし、温度選択行動は温度差ではなく異なる温度環境の中でより快適な温度を選択することである。温度選択の仕組みについて温度受容体の側面から考えると、(1) ハエには好みの温度が存在しそれを選択する、(2) 不快な温度を回避することで選択する温度が設定される、の2つの可能性が挙げられる。上述のように、TrpA1は24–29度で活性化する。この温度帯は、通常ハエが選択する温度 (約25度) に近い。TrpA1が反応する温度がハエの好みの温度であれば、*TrpA1^{ins}* は温度選択行動を示さず、ハエは温度勾配下で散逸して存在することが予想される。しかし、すでに記したとおり *TrpA1^{ins}* は約28度を選択することから、(1) の可能性はきわめて低いと考えられる。ハエにはTrpA1の他に、約40度の高温に対して活性化するTrpA ファミリーのPainless (Pain) および Pyrexia (Pyx)^{43, 64, 70)}、低温に対しては後述の低温受容体が存在する。以上のことから、ハエは不快な高温と低温の温度刺激を回避することで、選択する温度を設定しているのではないかと考えられている。

低温の受容体について、現在のところTrpP ファミリーに属するBrivido (Brv) が報告されている¹⁷⁾。GallioらはBrv1-3を同定し、低温の温度反応性を示すことを明らかにした。Brv1-3の詳細な発現分布は今のところ不明であるが、少なくともBrv1は成虫の触角 (Antenna) を構成する触角第三節 (3rd antennal segment) から伸びる触覚端刺 (Arista) の基部と触角第三節内のSacculusなどで発現する。Aristaの基部には、温度反応性の6つの細胞が同定されており、そのうちの3つがBrv1を発現し、冷センサーとして機能する。実際にその温度反応性を調べたところ、3つのニューロンは20度以下に反応することがCa²⁺ イメージングで明らかとなった。

最近の報告から、TRP チャンネル以外の温度受容体が同定されている。Gustatory receptor (Gr) に属するGr28bは、上述のAristaの基部にある残りの3つのニューロンで発現し、温センサーとして働くことが報告されている⁵¹⁾。また、NiらとChenらにより、Ir25aが温度受容体として機能することが報告されている^{8, 52)}。Irは哺乳類では保存されておらず、無脊椎動物においてのみ見られる。Niらは、Ir25aは共同受容体 (Co-receptor) として働き、Ir21とカップリングして機能することを明らかにした⁵²⁾。また、ChenらはIr25aが成虫では弦音器官で発現し、概日時計の温度同調に働くことを報告している⁸⁾。両報告の相違点として、前者はIr25aが20度以下の低温で活性化を示すのに対し、後者は20–30度の温度上昇時に活性化することが挙げられる。しかし、Niらが示唆しているように、弦音器官のIr25aは他のIrとカップリングするため、異なる温度反応性を示し

ているのかもしれない。そのほか、ドーパミン陽性ニューロン^{3, 71)}、ヒスタミン陽性ニューロン³³⁾もハエ成虫の温度選択行動に関与することが報告されている。これらの温度受容体や神経伝達物質が統合的に働くことで、外部環境にうまく適応していると考えられるが、まだ説明するに十分な点が多くあり、今後更なる研究が求められている。

9. ショウジョウバエの温度選択リズム

変温動物は、温度選択行動によりただ単に快適な温度帯に移動して、それに沿って体温を変化させる生き物と漠然と考えてしまうが、果たしてそれだけであろうか。たとえば野外では、カメレオンなど爬虫類は夜間捕食者から身を守るため薄暗い木陰や土の中などに身を隠す。一方日中は、擬態を利用して木の枝先など比較的捕食者の目の届かないところで、かつ日の当たる場所に現れ体温を太陽光により上昇させる。また、外気温が高温になりすぎると、体温も高温になり死んでしまう恐れもあるので、木陰や土の中などに隠れる^{26, 34)}。このような行動には日周性があるように見えるが、我々哺乳類の体温と同様に、時計により駆動されるものなのであるか？

Kanekoらはこの疑問に答える目的で、ショウジョウバエを用いて調べた³⁹⁾。著者らは、1日を3時間ごとに8つの時間帯に区切り、各時間帯において温度選択行動を測定し、各時間帯の選択された温度を比較した。その結果、野生型のハエは明暗サイクル下で夜明けには25度付近を選択し、夜明け前から日暮れ前にかけて選択する温度は上昇し、日暮れ前には26.5度付近を選択する。さらに日暮れ直後には24.5度付近の低い温度を選択し、そして夜明け前には25度付近を選択する明瞭なリズムを示した (図8 A)。また、このリズムは恒暗でも継続した (図8 A)。一方、時計遺伝子 *per* および *tim* の欠損突然変異体、*per⁰*、*tim⁰* ではリズムが消失したことから (図8 B, 8 C)、このリズムは概日時計により駆動されることが示唆された。著者らはこの行動を温度選択リズム (Temperature preference rhythms) と名づけた。

では、このリズムは脳内のどの時計細胞により駆動されるのだろうか？ 上述の歩行活動リズムでは朝の活動を制御する朝方時計細胞と夕方の活動を制御する夕方時計細胞により駆動されるが、温度選択リズムではどうだろうか？ 著者らは、*per⁰* を背景としてもち、GAL4-UAS システムを利用して特定の時計細胞だけで *per* を発現させたハエの系統を作成することで、温度選択リズムがどの細胞により駆動されるかを探索した。その結果、歩行活動リズムを駆動する細胞ではなく、脳背側部に局在する細胞 (Dorsal neuron2; DN2) により制御されることを明らかにした。これまでDN2の特定の機能については不明であったが、ここで初めてその機能が明らかにされた。

DN2が温度選択リズムの主要な時計として働くことが明らかにされたが、その他の時計細胞は温度選択リズムの制御に関与するのだろうか？ 関与するのであれば、各時計細胞間での相互作用において、どのような神経伝達物質がネットワークの形成に関わるのだろうか？ 合田らは、DH31が温度選択リズムの制御に関与することを初めて示した²²⁾。DH31は哺乳類のCalcitonin gene related peptideに類似した機能を持つ神経ペプチドであり、G蛋白質共役型受容

図8 温度選択リズム 野生型 (WT, A), per^0 (B), tim^0 (C) の明暗下 (灰色) と恒暗下 (黒色) の温度選択リズム。1日を8つの時間帯に分け、各時間帯での温度選択行動を測定し、グラフ化した。恒暗のグラフは、恒暗条件に移行して2日目 (DD Day2) に測定した結果を示している。野生型では、恒暗下でも明瞭なリズムを示すのに対し、 per^0 , tim^0 では恒暗で不明瞭なリズムを示した。グラフの表示は、図7と同じ方法で示した。灰色の領域は、暗期を示している。グラフのシンボルの近くにあるアスタリスクはZT1-3あるいはCT1-3のデータと比較したTukey-Kramer testによる統計処理結果を示す。ZT (Zeitgeber time), 概日因子時刻。CT (Circadian time), 概日時刻。*, $p < 0.05$ 。***, $p < 0.001$ 。文献 (39) より図を改変。

体のDH31受容体およびPDF受容体を活性化する⁶²⁾。著者らは、 $Dh31$ を欠損した変異体を使用し、その温度選択リズムを測定した。その結果、野生型は日暮れ前から日暮れ直後にかけて選択する温度が急激に低下し1度以上の温度差で低温にシフトするが、 $Dh31$ 変異体ではその温度差が約0.5度に有意に小さくなることがわかった。日暮れ前の選択温度は野生型と $Dh31$ 変異体の間ではほぼ同じであることから、DH31は夜の前半での温度選択の制御に重要であることが明らかとなった。最近の研究結果から、 $Dh31$ mRNAはDN1, LNVで発現し、それらの細胞群で周期的に発現していることが報告されており¹⁾、 $Dh31$ の周期的な発現がリズムの制御に寄与しているのかもしれない。

現在までに、DN2自体には温度や光を直接受容する受容体は同定されていない。しかしこれまでの結果から、DN2周辺には光や温度情報を受容するニューロンが投射しており、DN2周辺は環境情報を統合する場のように見える。この推察をさらに補うものとして、最近の報告から、朝方の活動を制御する朝方時計細胞のs-LNVが、時間特異的に温度選択リズムの制御に関与することが報告された⁶⁶⁾。従って、温度選択リズムの制御にはDN2を中心とした神経ネットワークを形成し、時間帯ごとにカップリングするグループを変化させるような可塑的で柔軟なネットワークを形成することで、複雑に変化する外部環境への適応をより正確に行っているのかもしれない (図9)。

10. おわりに

本総説では、キイロショウジョウバエの研究から明らかになりつつある、概日時計が温度サイクルに同調する仕組みと、温度選択行動に概日時計が与える影響を解説した。

図9 温度選択リズムの制御機構の模式図 これまでの結果をまとめた温度選択リズムの制御機構の模式図。昼間の温度上昇には、DN2による制御が必要であり、夜の前半の温度低下にはDH31による制御が、そして夜の後半にはACs-s-LNV-DN2による制御が必要である。

一見、この二つの行動は、不思議な関係性を持っていると思える。適切な温度選択を行うならば、ショウジョウバエは常に好みの温度に存在し、環境の温度変化に暴露されていないのではないかと。また、一日の中でショウジョウバエが好む温度が変わるのならば、その温度変化に概日時計が同調するのではないかと。自作自演のように、概日時計は、温度選択行動に影響を与えることで、自身をある一定のリズムに同調させているのではないかと。そのようなことを思い巡らせるとまだまだ研究が足りていないことに気付かされる。研究の楽しみはまだまだ終わらない。

謝 辞

本稿で紹介した研究の多くは、岡山大学の富岡憲治先生、Würzburg 大学の Charlotte Helfrich-Förster 先生、Cincinnati Children's Hospital Medical Center の濱田文香先生のご協力のもとに行われました。今回、寄稿の機会を与えて頂きました佐賀大学の嬉正勝先生、神戸大学の佐倉緑先生に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Abruzzi, K.C., Zadina, A., Luo, W., Wiyanto, E., Rahman, R., Guo, F., Shafer, O. & Rosbash, M.: PLOS Genet., 13, e1006613 (2017)
- 2) Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C. & Rosbash, M.: Cell, 93, 791-804 (1998)
- 3) Bang, S., Hyun, S., Hong, S.T., Kang, J., Jeong, K., Park, J.J., Choe, J. & Chung, J.: PLoS Genet., 7, e1001346 (2011)
- 4) Bargiello, T.A., Jackson, F.R. & Young, M.W.: Nature, 312, 752-754 (1984)
- 5) Baylies, M.K., Bargiello, T.A., Jackson, F.R. & Young, M.W.: Nature, 326, 390-392 (1987)
- 6) Busza, A., Murad, A. & Emery, P.: J. Neurosci., 27, 10722-10733 (2007)
- 7) Ceriani, M.F., Darlington, T.K., Staknis, D., Más, P., Petti, A.A., Weitz, C.J. & Kay, S.A.: Science, 285, 553-6 (1999)
- 8) Chen, C., Buhl, E., Xu, M., Croset, V., Rees, J.S., Lilley, K.S., Benton, R., Hodge, J.J.L. & Stanewsky, R.: Nature, 527, 516-520 (2015)
- 9) Collins, B., Kaplan, H.S., Cavey, M., Lelito, K.R., Bahle, A.H., Zhu, Z., Macara, A.M., Roman, G., Shafer, O.T. & Blau, J.: PLoS Biol., 12, e1001959 (2014)
- 10) Dillon, M.E., Wang, G., Garrity, P.A. & Huey, R.B.: J. Therm. Biol., 34, 109-119 (2009)
- 11) Doyle, S. & Menaker, M.: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 72, 499-508 (2007)
- 12) Dunlap, J.C.: Cell, 96, 271-90 (1999)
- 13) Edery, I., Zwiebel, L.J., Dembinska, M.E. & Rosbash, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 2260-2264 (1994)
- 14) Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J.C. & Rosbash, M.: Neuron, 26, 493-504 (2000)
- 15) Foster, R.G. & Hankins, M.W.: Prog. Retin. Eye Res., 21, 507-527 (2002)
- 16) Frenkel, L., Muraro, N.I., Beltrán González, A.N., Marcora, M.S., Bernabó, G., Hermann-Luibl, C., Romero, J.I., Helfrich-Förster, C., Castaño, E.M., Marino-Busjle, C., Calvo, D.J. & Ceriani, M.F.: Cell Rep., 19, 72-85 (2017)
- 17) Gallio, M., Ofstad, T.A., Macpherson, L.J., Wang, J.W. & Zuker, C.S.: Cell, 144, 614-624 (2011)
- 18) Gaston, S. & Menaker, M.: Science, 160, 1125-7 (1968)
- 19) Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A.-M., Myers, M.P., Sehgal, A., Young, M.W. & Weitz, C.J.: Science, 270, 811-815 (1995)
- 20) Glaser, F.T. & Stanewsky, R.: Curr. Biol., 15, 1352-63 (2005)
- 21) Goda, T., Leslie, J.R. & Hamada, F.N.: J. Vis. Exp., 1-8 (2014)
- 22) Goda, T., Tang, X., Umezaki, Y., Chu, M.L., Kunst, M., Nitabach, M.N. & Hamada, F.N.: J. Neurosci., 36, 11739-11754 (2016)
- 23) Grima, B., Chélot, E., Xia, R. & Rouyer, F.: Nature, 431, 869-873 (2004)
- 24) Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J. & Garrity, P.A.: Nature, 454, 217-220 (2008)
- 25) Hamasaka, Y., Rieger, D., Parmentier, M.-L., Grau, Y., Helfrich-Förster, C. & Nässel, D.R.: J. Comp. Neurol., 505, 32-45 (2007)
- 26) Hammel, H.T., Caldwell, F.T. & Abrams, R.M.: Science, 156, 1260-2 (1967)
- 27) Hardin, P.E., Hall, J.C. & Rosbash, M.: Nature, 343, 536-540 (1990)
- 28) Head, L.M., Tang, X., Hayley, S.E., Goda, T., Umezaki, Y., Chang, E.C., Leslie, J.R., Fujiwara, M., Garrity, P.A. & Hamada, F.N.: Curr. Biol., 25, 1063-1068 (2015)
- 29) Helfrich-Förster, C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 612-616 (1995)
- 30) Helfrich-Förster, C.: J. Biol. Rhythms, 15, 135-154 (2000)
- 31) Helfrich-Förster, C., Edwards, T., Yasuyama, K., Wisotzki, B., Schneuwly, S., Stanewsky, R., Meinertzhagen, I.A. & Hofbauer, A.: J. Neurosci., 22, 9255-9266 (2002)
- 32) Hermann-Luibl, C., Yoshii, T., Senthilan, P.R., Dirksen, H. & Helfrich-Förster, C.: J. Neurosci., 34, 9522-9536 (2014)
- 33) Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Hwang, S., Jeon, K., Chun, B., Hyun, S., Lee, Y. & Kim, J.: J. Neurosci., 26, 7245-7256 (2006)
- 34) Huey, R.B.: Science, 184, 1001-1003 (1974)
- 35) Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S., Bae, E. & Kim, J.: Neuron, 48, 267-268 (2005)
- 36) Im, S.H. & Taghert, P.H.: J. Comp. Neurol., 518, 1925-1945 (2010)
- 37) Jackson, F.R., Bargiello, T.A., Yun, S.-H. & Young, M.W.: Nature, 320, 185-188 (1986)
- 38) Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P. & Rosbash, M.: Genes Dev., 21, 1675-86 (2007)
- 39) Kaneko, H., Head, L.M., Ling, J., Tang, X., Liu, Y., Hardin, P.E., Emery, P. & Hamada, F.N.: Curr. Biol., 22, 1851-1857 (2012)
- 40) Kaneko, M. & Hall, J.C.: J. Comp. Neurol., 422, 66-94 (2000)
- 41) Konopka, R.J. & Benzer, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,

- 68, 2112-6 (1971)
- 42) Kunst, M., Hughes, M.E., Raccuglia, D., Felix, M., Li, M., Barnett, G., Duah, J. & Nitabach, M.N.: *Curr. Biol.*, 24, 2652-2664 (2014)
 - 43) Lee, Y., Lee, Y., Lee, J., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Hong, S.T., Bae, E., Kaang, B.K. & Kim, J.: *Nat. Genet.*, 37, 305-310 (2005)
 - 44) Lee, Y. & Montell, C.: *J. Neurosci.*, 33, 6716-6725 (2013)
 - 45) Lim, C., Chung, B.Y., Pitman, J.L., McGill, J.J., Pradhan, S., Lee, J., Keegan, K.P., Choe, J. & Allada, R.: *Curr. Biol.*, 17, 1082-1089 (2007)
 - 46) Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W.A., Abboud, F.M. & Welsh, M.J.: *Nat. Neurosci.*, 6, 267-273 (2003)
 - 47) Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P.E. & Edery, I.: *Neuron*, 24, 219-230 (1999)
 - 48) Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R.G., Houl, J., Uno, K.D., Kasukawa, T., Dauwalder, B., Itoh, T.Q., Takahashi, K., Ueda, R., Hardin, P.E., Tanimura, T. & Ueda, H.R.: *Genes Dev.*, 21, 1687-700 (2007)
 - 49) Miyasako, Y., Umezaki, Y. & Tomioka, K.: *J. Biol. Rhythms*, 22, 115-126 (2007)
 - 50) Muraro, N.I., Pirez, N. & Ceriani, M.F.: *Neuroscience*, 247, 280-293 (2013)
 - 51) Ni, L., Bronk, P., Chang, E.C., Lowell, A.M., Flam, J.O., Panzano, V.C., Theobald, D.L., Griffith, L.C. & Garrity, P.A.: *Nature*, 500, 580-584 (2013)
 - 52) Ni, L., Klein, M., Svec, K. V., Budelli, G., Chang, E.C., Ferrer, A.J., Benton, R., Samuel, A.D.T. & Garrity, P.A.: *Elife* 5, 1-12 (2016)
 - 53) Nishiitsutsuji-Uwo, J. & Pittendrigh, C.S.: *Z. Vgl. Physiol.*, 58, 1-13 (1968)
 - 54) Renn, S.C., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C. & Taghert, P.H.: *Cell*, 99, 791-802 (1999)
 - 55) Rensing, L. & Ruoff, P.: *Chronobiol. Int.* 19, 807-64 (2002)
 - 56) Rieger, D., Stanewsky, R. & Helfrich-Förster, C.: *J. Biol. Rhythms* 18, 377-391 (2003)
 - 57) Roberts, S.K.: *Science*, 148, 958-9 (1965)
 - 58) Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M. & Hall, J.C.: *Cell*, 93, 805-814 (1998)
 - 59) Sayeed, O. & Benzer, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 6079-6084 (1996)
 - 60) Sehadvova, H., Glaser, F.T., Gentile, C., Simoni, A., Giesecke, A., Albert, J.T. & Stanewsky, R.: *Neuron*, 64, 251-266 (2009)
 - 61) Sehgal, A., Price, J., Man, B. & Young, M.: *Science* 263, 1603-6 (1994)
 - 62) Shafer, O.T., Kim, D.J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. & Taghert, P.H.: *Neuron*, 58, 223-237 (2008)
 - 63) Shafer, O.T., Rosbash, M. & Truman, J.W.: *J. Neurosci.*, 22, 5946-5954 (2002)
 - 64) Sokabe, T., Tsujiuchi, S., Kadowaki, T. & Tominaga, M.: *J. Neurosci.*, 28, 9929-9938 (2008)
 - 65) Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J. & Rosbash, M.: *Nature*, 431, 862-868 (2004)
 - 66) Tang, X., Roessingh, S., Hayley, S.E., Chu, M.L., Nobuaki, K., Wolfgang, W., Song, S., Stanewsky, R. & Hamada, F.N.: *Elife*, 6, e23206 (2017)
 - 67) Tataroglu, O. & Emery, P.: *Curr. Opin. insect Sci.*, 7, 51-57 (2015)
 - 68) Tataroglu, O., Zhao, X., Busza, A., Ling, J., O' Neill, J.S. & Emery, P.: *Cell*, 163, 1214-1224 (2015)
 - 69) Tomioka, K., Sakamoto, M., Harui, Y., Matsumoto, N. & Matsumoto, A.: *J. Insect Physiol.*, 44, 587-596 (1998)
 - 70) Tracey, W.D., Wilson, R.I., Laurent, G. & Benzer, S.: *Cell*, 113, 261-273 (2003)
 - 71) Ueno, T., Tomita, J., Kume, S. & Kume, K.: *PLoS One*, 7, 1-11 (2012)
 - 72) Viswanath, V., Story, G.M., Peier, A.M., Petrus, M.J., Lee, V.M., Hwang, S.W., Patapoutian, A. & Jegla, T.: *Nature*, 423, 822-823 (2003)
 - 73) Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.J., Dushay, M.S. & Hall, J.C.: *J. Biol. Rhythms*, 8, 67-94 (1993)
 - 74) Wijnen, H., Naef, F., Young, M.W., Takahashi, J., Schibler, U., Rosbash, M., Rosbash, M., Hall, J., Webb, A., Shang, Y. & Tang, C.: *BMC Biol.*, 393, 341-365 (2005)
 - 75) Wolfgang, W., Simoni, A., Gentile, C. & Stanewsky, R.: *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, 280, 20130959 (2013)
 - 76) Yoshii, T., Fujii, K. & Tomioka, K.: *J. Biol. Rhythms*, 22, 103-114 (2007)
 - 77) Yoshii, T., Hermann-Luibl, C. & Helfrich-Förster, C.: *Commun. Integr. Biol.*, 9, e1102805 (2016)
 - 78) Yoshii, T., Hermann-Luibl, C., Kistenpfennig, C., Schmid, B., Tomioka, K. & Helfrich-Förster, C.: *J. Neurosci.*, 35, (2015)
 - 79) Yoshii, T., Hermann, C. & Helfrich-Förster, C.: *J. Biol. Rhythms*, 25, 387-398 (2010)
 - 80) Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T. & Tomioka, K.: *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1176-1184 (2005)
 - 81) Yoshii, T., Sakamoto, M. & Tomioka, K.: *Zoolog. Sci.* 19, 841-850 (2002)
 - 82) Yoshii, T., Todo, T., Wülbeck, C., Stanewsky, R. & Helfrich-Förster, C.: *J. Comp. Neurol.*, 508, 952-966 (2008)
 - 83) Yoshii, T., Vanin, S., Costa, R. & Helfrich-Förster, C.: *J. Biol. Rhythms*, 24, 452-464 (2009)
 - 84) Yu, Q., Jacquier, A.C., Citri, Y., Hamblen, M., Hall, J.C. & Rosbash, M.: *Genetics*, 84, 784-788 (1987)
 - 85) Zars, T.: *J. Comp. Physiol. A*, 187, 235-42 (2001)
 - 86) Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Reddy, P., Konopka, R.J., Kyriacou, C.P., Rosbash, M. & Hall, J.C.: *Cell*, 39, 369-376 (1984)

Abstract

Circadian temperature adaptations in the fruit fly *Drosophila melanogaster*

Yujiro UMEZAKI¹, Taishi YOSHII²

¹Visual Systems Group, Abrahamson Pediatric Eye Institute, Division of Pediatric Ophthalmology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH, 45229, USA

²Graduate School of Natural Science and Technology,

For ectothermic animals such as insects, ambient temperature is a vastly important environmental factor, as it severely affects their life activities. For example, low temperature often causes low activity, and its long-term exposure may result in death. High temperature is a more life-threatening condition for insects, as even a short-term exposure could be lethal. Since ambient temperature changes in a circadian manner, insects have the capability to predict the time of these changes using an internal clock – circadian clock. Since the 1990s, the molecular mechanisms of the circadian clock have been unveiled in some model animals, flies and mice. Particularly, the fruit fly *Drosophila melanogaster* has been a very useful model to investigate molecular and neuronal basis of the clock and has developed excellent genetic tools for manipulating neurons responsible for the clock in the brain. *Drosophila* researchers, including the authors, have studied the reciprocal relationship between the clock and daily temperature adaptations in *Drosophila*. In this review, we would like to summarize the progress that has been made in this field.