

博士論文

キイロシヨウジヨウバエ概日時計
を制御する時計神経回路の網羅的機能解析

2024 年 9 月

関口 学

岡山大学大学院

自然科学研究科

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の論文を基礎とする。

1. The Trissin/TrissinR signaling pathway in the circadian network regulates evening activity in *Drosophila melanogaster* under constant dark conditions.
Sekiguchi M, Katoh S, Yokosako T, Saito A, Sakai M, Fukuda A, Itoh TQ, Yoshii T.
Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 704, Paper No.149705 (2024).
2. A detailed re-examination of the *period* gene rescue experiments shows that four to six Cryptochrome-positive posterior dorsal clock neurons (DN1p) of *Drosophila melanogaster* can control morning and evening activity.
Sekiguchi M, Reinhard N, Fukuda A, Katoh S, Rieger D, Helfrich-Förster C, Yoshii T.
Journal of Biological Rhythms *in press* (2024)

目次

背景.....	3
第1章：キイロショウジョウバエ時計細胞の網羅的機能解析	
1.1. 要旨	16
1.2. 序論	17
1.3. 材料と方法	20
1.4. 結果	25
1.5. 考察	60
第2章：キイロショウジョウバエ Trissin/TrissinR シグナル伝達の機能解析	
2.1. 要旨	67
2.2. 序論	68
2.3. 材料と方法	70
2.4. 結果	73
2.5. 考察	89
総括	90
謝辞	93
引用文献	94

背景

概日時計：約 24 時間のリズムを生み出す生物時計

概日時計は、約 24 時間のリズムを生み出す生物時計である。これは、変化する地球環境へ適応するために生物が進化の過程で獲得した生理機能であると考えられている。その時計は、遺伝子発現、生理、代謝、行動など様々な周期現象の制御に関わっている (Dunlap et al., 2004; Hut & Beersma, 2011)。概日時計により生み出されるリズム（概日リズム）の発見は古く、数世紀前にすでに観察されていた (Kuhlman et al., 2018)。その後の研究により、シアノバクテリアなどの単細胞生物から多細胞生物であるヒトに至るまで、幅広い生物種で保存されていることが明らかになった (Ouyang et al., 1998; Paranjpe & Sharma, 2005)。これらの生物が示す、周期的な生理状態や行動の変化は、環境変化への単なる応答だけでなく、周期的な環境変化を事前に予測した変化である (Pittendrigh & Minis, 1972; Vaze & Sharma, 2013)。以下の 3 つの特徴が概日リズムを判断する基準として用いられている (Vitaterna et al., 2001)。

- 1) 自律振動性：外部環境（光や温度など）が一定の場合でも約 24 時間のリズムを示す。
- 2) 同調性：体内の自律振動は、同調因子（Zeitgeber）を頼りに外部環境サイクルへ同調できる。
- 3) 温度補償性：時計周期は温度変化の影響を受けないこと。

概日時計を制御する分子メカニズム

概日時計は、負の転写翻訳フィードバックループ(negative transcription-translation feedback loops)という、生物種を超えて保存された分子メカニズムによって概日リズムを生み出している。フィードバックループは、時計遺伝子と呼ばれる正の転写制御因子と負の転写制御因子からなる。正の転写制御因子は、負の転写制御因子の発現を促進する。一

方で、負の転写制御因子は、核内で正の転写制御因子による自身の転写を阻害する。これに加えて、翻訳後修飾（リン酸化、脱リン酸化、アセチル化など）を受けることで転写制御因子の量的な変化を調節している。この転写・翻訳の2つのレベルで行われる複雑な制御が適切なバランスで行われることで、約24時間のリズムを維持することができている (Hardin, 2011; Takahashi, 2017)。

キイロショウジョウバエ（以下ショウジョウバエ）では、1971年に時計遺伝子 *period* 突然変異体 (*per⁰¹*) が単離された (Konopka & Benzer, 1971)。1990年代の概日リズム研究分野の急速な進展により、時計遺伝子として *timeless (tim)*、*Clock (Clk)*、*cycle (cyc)* が特定され、これらは *per* とともに概日リズムを駆動するフィードバックループを形成することが示された (Allada et al., 1998; Sehgal et al., 1994; Rutila et al., 1998)。さらに、1990年代後半から2000年代初頭にかけて、概日光受容体の *cryptochrome (cry)*、そして第二のフィードバックループに関与する転写制御因子である *vri* (*vri*)、*PAR domain protein 1 (pdp1)* 遺伝子が立て続けに特定された (Blau & Young, 1999; Cyran et al., 2003; Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998)。これらの時計遺伝子から想定されている現在の分子メカニズムは以下のように説明されている（図0-1）。

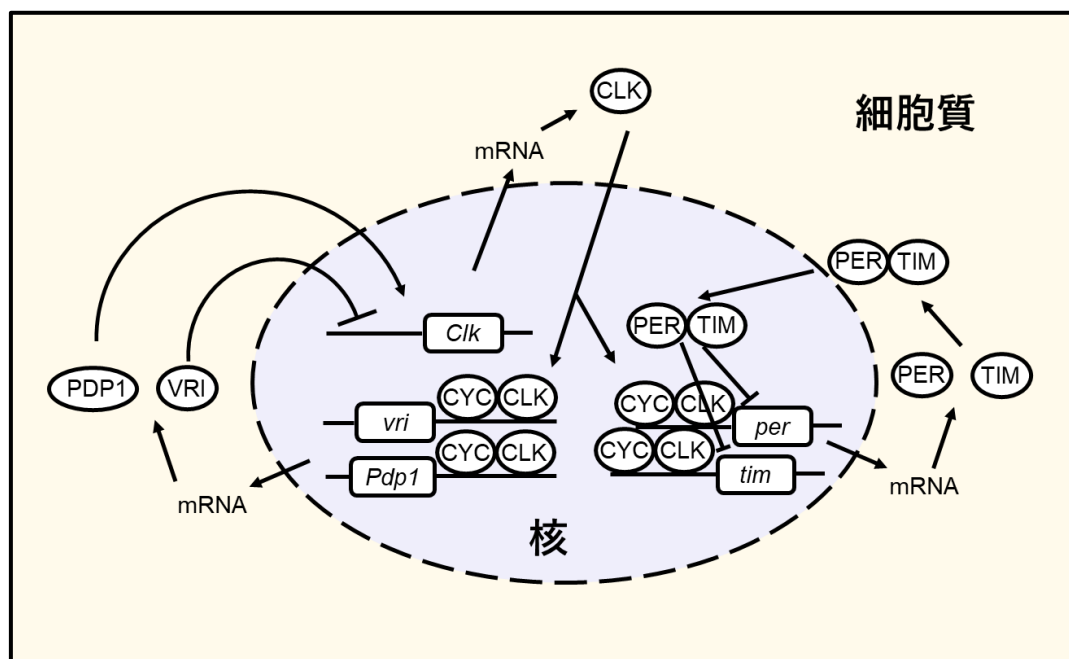


図 0-1. 概日時計の分子メカニズム

時計遺伝子群により構成された転写翻訳フィードバックループの概念図。

第 1 のフィードバックループ：明け方から夕方にかけて、正の転写制御因子である CLOCK (CLK) と CYCLE (CYC) がヘテロ二量体を形成し、負の転写制御因子である *per* と *tim* のエンハンサー領域である E-Box に結合することで、転写を開始する (Hao et al., 1997)。これにより、PERIOD (PER)、TIMELESS (TIM) の翻訳が促進され、細胞質内に蓄積する。蓄積した TIM は PER の PAS (Per-Arnt-Sim) ドメインと干渉することで結合し、PER/TIM ヘテロ二量体を形成する。二量体の形成により、PER の安定化をすると共に、核へ移行が可能になる。核へ移行した PER/TIM ヘテロ二量体は *per*、*tim* の E-box に結合している CLK/CYC ヘテロ二量体に結合し、*per*、*tim* の転写を抑制する (Lee et al., 1999)。CLK/CYC ヘテロ二量体による転写が減少すると、PER/TIM ヘテロ二量体も減少し、再び CLK/CYC ヘテロ二量体による *per*、*tim* の転写、翻訳が行われる。

第 2 のフィードバックループ：*per*、*tim* を周期的に転写する CLK は *vri*、*pdp1* 遺伝子と共に第 2 のループを形成している。VRILLE (VRI) は *Clk* 遺伝子の負の転写制御因子として

働き、PDP1 は正の転写制御因子として働く。第 2 のループによる制御で *Clk* の転写に周期性が生まれ、第 1、第 2 ループ合わせて約 24 時間のリズムをもたらしている(Blau & Young, 1999; Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003)。

概日時計の分子メカニズムが生み出す概日リズムは、約 24 時間周期であるため、外的な同調因子がなければ少しずつ環境サイクルとの間にズレが生じてくる。そこで、概日時計は、地球の自転によって作られる 24 時間周期の光サイクルを頼りに、時計のズレをリセットしている。この概日時計が光サイクルに同調するメカニズムは、

CRYPTOCHROME (CRY)と呼ばれるタンパク質を中心とした時計リセット機構により説明されている (図 0-2)。これはショウジョウバエが光を浴びると CRY が活性化し、JETLAG (JET)タンパク質をリクルートし、ユビキチン化を介したタンパク質分解で TIM の分解を引き起こす。CRY の存在により、朝日が出るころに PER/TIM ヘテロ二量体は TIM を失い、核に移行できず、CLK/CYC ヘテロ二量体が行う *per*、*tim* の転写抑制が解除されはじめる(Ceriani et al., 1999; Emery et al., 1998; Koh et al., 2006; Stanewsky et al., 1998)。その他にも、CRY と共に TIM 分解に関わる *shaggy* 遺伝子や PER の安定化を担う *double time* 遺伝子など多数の因子が協調することで、光環境に合わせた概日時計の調整が可能になっている(Kloss et al., 1998; Martinek et al., 2001)。

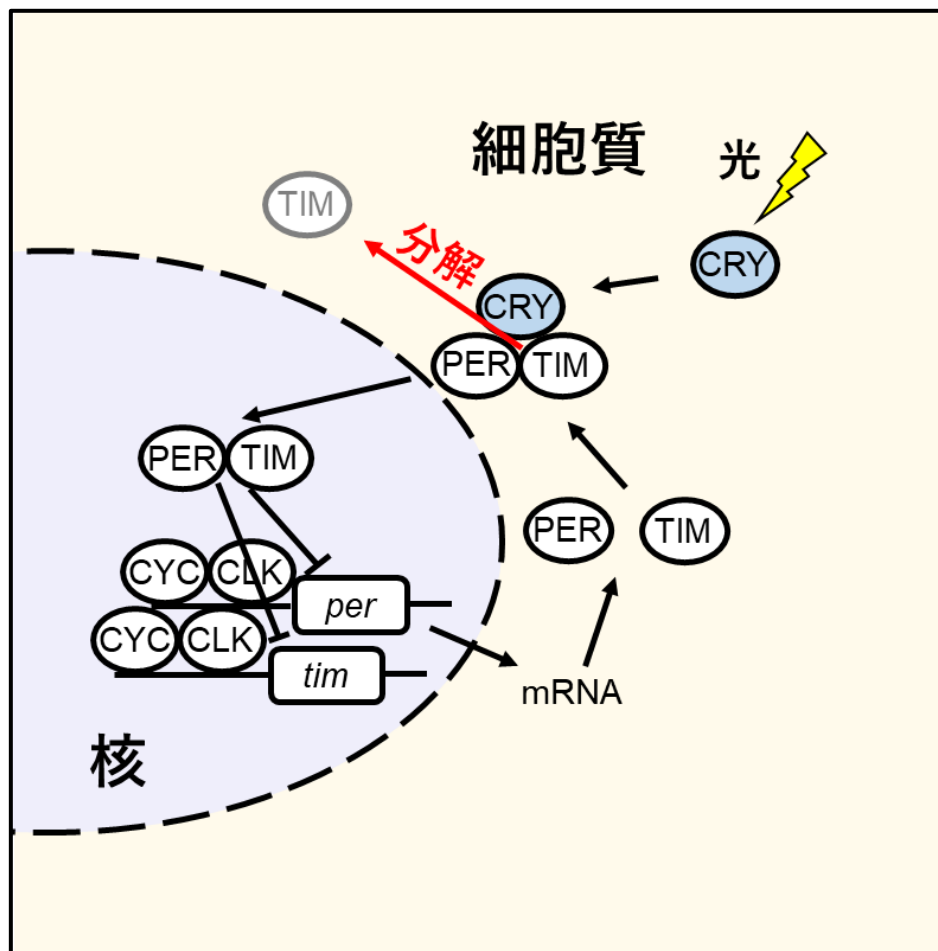


図 0-2. 概日時計の光同調メカニズム

ショウジョウバエ光同調機構の中心である CRY による TIM 分解経路を示した概念図。

温度補償性

光は、概日時計を同調させる最も強い同調因子である。しかし、光だけでなく温度も同調因子として利用されている (Buhr et al., 2010; Pittendrigh, 1954)。一般的に化学反応は温度の上昇とともに反応が加速する。その一方で、概日リズムは一定の温度範囲で比較的安定している (Kurosawa & Iwasa, 2005; Pittendrigh, 1954)。そのメカニズムの全容はまだ完全に理解はされていないが、ショウジョウバエでは時計タンパク質やその特定のリン酸化部位が温度補償性の役割を担っていることが報告されている (Joshi et al., 2022; Matsumoto et al., 1999; Singh et al., 2019)。また、シアノバクテリアでは、温度上昇に伴う振幅の増加と時計の速度上昇が相殺されることで、周期が安定することが報告されている (Zhang & Li, 2023)。

このように、概日時計は時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループによる自律的なリズムの形成に加えて、光などの同調因子を介した時計のリセット、そして温度に対する抵抗性をもつことで、自律的な約 24 時間のリズムを環境に合わせて調節している。

概日時計を制御する脳内神経ネットワーク

古典的な外科的切除実験により、概日時計を制御する中枢は脳領域に存在することが明らかになった。例えば、マデイラゴキブリとフタホシコオロギでは、視葉、イエスズメでは、松果体、ラットでは、視交叉上核が概日時計の中枢として同定されている (Gaston & Menaker, 1968; Moore & Eichler, 1972; Page, 1990; Tomioka & Chiba, 1992)。しかし、これらの研究では組織レベルの特定に留まっていた。この 20 年ほどの間に、蛍光免疫染色技術や共焦点レーザー顕微鏡の発展、そしてショウジョウバエでは GAL4/UAS システムなどのトランスジェニックショウジョウバエ系統の作出に伴い、細胞レベルでの時計中枢の特定が進んでいる (Helfrich-Förster, 2003; Kaneko & Hall, 2000)。ショウジョウバエでは、脳内に約 150 個存在する神経細胞（時計細胞）が時計の中枢であることがわかっており、

それぞれが異なる機能、形態、神経伝達物質を持っている。これらの時計細胞は、その解剖学的位置に基づいて以下の 9 つのグループに分類されている：small ventrolateral neurons (s-LNv)、large ventrolateral neurons (l-LNv)、5th ventrolateral neuron (5th LNv、5th LN、5th s-LNv としても知られる) (Schubert et al., 2018)、dorsolateral neurons (LNd)、lateral posterior neurons (LPN)、anterior dorsal neurons 1 (DN1a)、posterior dorsal neurons 1 (DN1p)、dorsal neurons 2 (DN2)、dorsal neurons 3 (DN3) (図 0-3; Helfrich-Förster et al., 2007; King & Sehgal, 2020)。

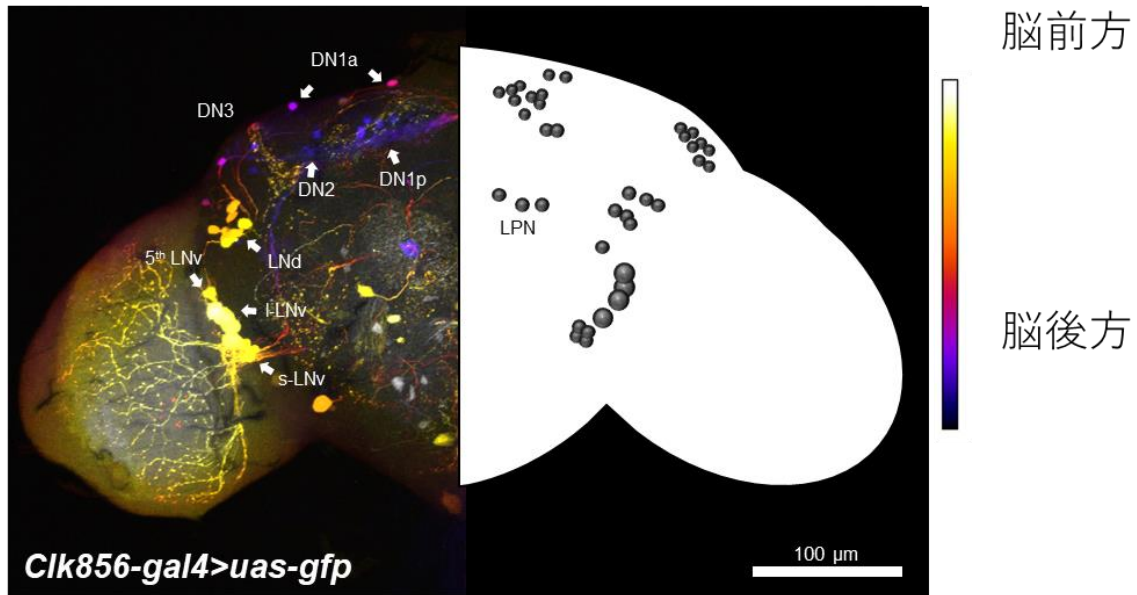


図 0-3. キイロショウジョウバエ概日時計を制御する神経ネットワーク

Clk856-Gal4 > UAS-gfp 系統の半脳を示している。(左) 抗 GFP 抗体で時計細胞を可視化している。(右) 時計細胞の位置を示した模式図。白色は脳前方に細胞が位置していることを示し、紫色は脳後方に位置していることを示している。

ショウジョウバエは、明暗 (LD) 条件下で二峰性の歩行活動リズムを示す。この朝方 (M) と夕方 (E) のピークは 2 つの振動体によって制御されていると考えられている (Helfrich-Förster, 2000)。s-LNV と I-LNV は、朝方の細胞 (M 細胞) として定義され、夜明けを予測する。M 細胞は、主要なペースメーカーとして機能し、恒暗条件 (DD) で自由継続リズムを制御している (Grima et al., 2004; Helfrich-Förster, 1998; Hermann et al., 2012; Renn et al., 1999; Shafer & Taghert, 2009; Stoleru et al., 2004; Yoshii et al., 2009)。一方、LNd と 5th LNV は夕方の細胞 (E 細胞) として定義され、LD 条件下で夕方の活動を制御する (Grima et al., 2004; Picot et al., 2007; Stoleru et al., 2004)。DN2 は温度同調、温度嗜好性リズムに関与していることが報告されている。時計細胞群の中でも DN1 細胞群はその役割が多岐にわたり、光・温度同調、交尾行動、睡眠などを制御している (Guo et al., 2016;

Kaneko et al., 2012; Picot et al., 2009; Yadlapalli et al., 2018)。また、他の時計細胞とは異なり、朝方と夕方に関わることから、CRY 陽性の DN1p は DN-M 細胞 (M-DN)として、CRY 陰性の DN1p は DN-E 細胞 (E-DN)と区別されている(Chatterjee et al., 2018)。

それぞれの時計細胞は、異なる神経伝達物質を用いた概日時計の制御を行なっている(図 0-4)。s-LNv と l-LNv では神経ペプチド Pigment dispersing factor (PDF)が発現しており、朝方の活動制御、自由継続リズムの維持、その他の時計細胞への情報伝達を担っている(Cusumano et al., 2009; Lear et al., 2009; Lin et al., 2004; Renn et al., 1999)。s-LNv は、他にもグリシンや small Neuropeptide F (sNPF)を情報伝達に利用している(Frenkel et al., 2017; Johard et al., 2009)。LNd では、ion transport peptide (ITP)、Neuropeptide F (NPF)、sNPF (small neuropeptide F)、Trissin が発現し、それぞれが時計情報の伝達に利用されている。特に、夕方の活動制御に関わることがわかっている(Hermann et al., 2012; Hermann-Luibl et al., 2014; Sekiguchi et al., 2024)。また、6 つの細胞体からなる LNd は、他の時計細胞群と比べて多くの神経伝達物質が使われていることから、3 つのサブグループ (E1、E2、E3 ニューロン) に分類されている。E1 ニューロンは神経ペプチド Trissin と sNPF (small neuropeptide F)を発現する 2 つの LNd。E2 ニューロンは、Neuropeptide F (NPF)と ion transport peptide (ITP)を発現する LNd。E3 ニューロンは 3 つの LNd があり、そのうち 2 つは NPF を発現している(Ma et al., 2021)。また、DN1p や LPN などで発現する Allatostatin C の受容体が LNd で発現しており、夕方の活動オフセットへの関与も報告されている(Díaz et al., 2019)。DN1a は、神経ペプチド CChamide1、IPNamide、を発現しているが、IPNamide の機能はまだわかっていない。他にも情報伝達としてグルタミン酸も使用している(Fujiwara et al., 2018; Hamasaka et al., 2007; Shafer et al., 2006)。DN1p は、神経ペプチド、Allatostatin C、CNMamide、Diuretic Hormone 31 を発現しており、DN1a 同様グルタミン酸も情報伝達に使用している (Abruzzi et al., 2017; Díaz et al., 2019; Hamasaka et al., 2007; Kunst et al., 2014)。LPN は、Allatostatin A、Allatostatin C、

Diuretic Hormone 31 を発現している (Chen et al., 2016; Díaz et al., 2019; Ni et al., 2019; Reinhard et al., 2022a)。

これまでは、主に神経ペプチドに対する抗体や Gal4/UAS システムを用いた神経細胞の形態観察が頻繁に行われていた (Fernández et al., 2008; Fujiwara et al., 2018; Johard et al., 2009; Reinhard et al., 2022a; Reinhard et al., 2022b)。さらに、特定のシナプス前ニューロンに接続するシナプス後ニューロンを特定する Trans-Tango 法が開発され、少しずつ時計細胞間、または時計細胞からその他の細胞への接続が明らかになっている (Dreyer et al., 2019; Guo et al., 2018; Reinhard et al., 2022a; Reinhard et al., 2022b; Sorkaç et al., 2023; Talay et al., 2017)。また、近年ショウジョウバエ脳内のコネクトームデータが完成した (Scheffer et al., 2020)。現在では、公開されている脳内コネクトームのデータから、部分的ではあるものの時計細胞間のコネクトーム解析を実施した研究が報告されている (Shafer et al., 2022)。さらに、2023 年に新たにコネクトームデータ (FlyWire) が公開された (Dorkenwald et al., 2023; Schlegel et al., 2023)。FlyWire データをもとに、現在では全時計細胞のコネクトームが解析されている (Reinhard et al., 2023)。

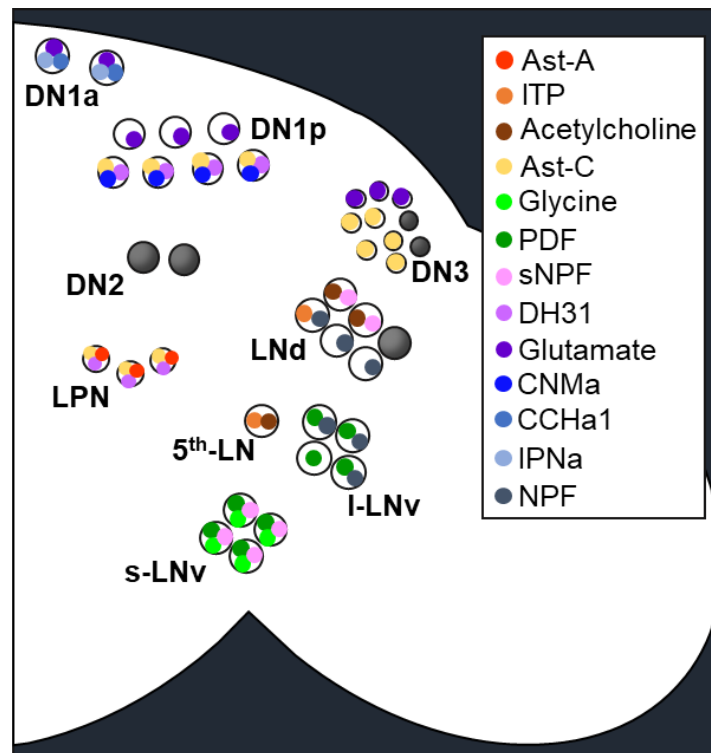


図 0-4. 時計神経ネットワークに関わる神経伝達物質

ショウジョウバエ右脳の模式図。各時計細胞で発現している神経伝達物質を色付きの丸で示している。

Gal4/UAS システム：時計細胞の機能解析で用いるキイロショウジョウバエの遺伝学

キイロショウジョウバエを用いた概日時計研究では、Gal4/UAS システムと呼ばれる遺伝学的手法が頻繁に利用されている（図 0-5）。これは、遺伝子の発現部位を決定するエンハンサーに酵母由来の転写因子である *gal4* 遺伝子を接続したコンストラクトを導入したショウジョウバエ（Gal4 系統）と、その転写制御領域である UAS 配列の下流に任意の遺伝子を接続したコンストラクトを導入したショウジョウバエ（UAS 系統）を用いる。このシステムでは、Gal4 系統と UAS 系統を交配させることで、その子孫 (F1) では、エンハンサーにより決められた組織・細胞でのみ GAL4 タンパク質が発現し、UAS 配列に結合することで、UAS 配列下流の遺伝子発現が誘導される (Owald et al., 2015)。GAL4 タンパク質の発現パターンは、エンハンサーに依存する。従って、異なるエンハンサーを用いることで異なる組織で任意の遺伝子発現を誘導することができる。近年では、数万種類のエンハンサーを元に Gal4 系統が作製されている (Pfeiffer et al., 2008)。しかし、多くの Gal4 系統では、目的組織以外での GAL4 発現が研究の進行を阻害している。この問題を回避するために、目的組織以外での GAL4 発現を抑制する Split-GAL4 システムが開発された (Luan et al., 2006; Pfeiffer et al., 2010)。Split-Gal4 システムでは、2 つのドメインからなる GAL4 タンパク質をそれぞれ異なるエンハンサーで発現させ、それぞれのドメインが共発現する組織でのみ、Gal4/UAS システムが機能する。概日時計の研究分野も含め、ショウジョウバエの様々な研究分野では、その分野に有用なエンハンサー情報がまとめられている (Ariyapala et al., 2020; Aso et al., 2009; Marin et al., 2020; Sekiguchi et al., 2020)。

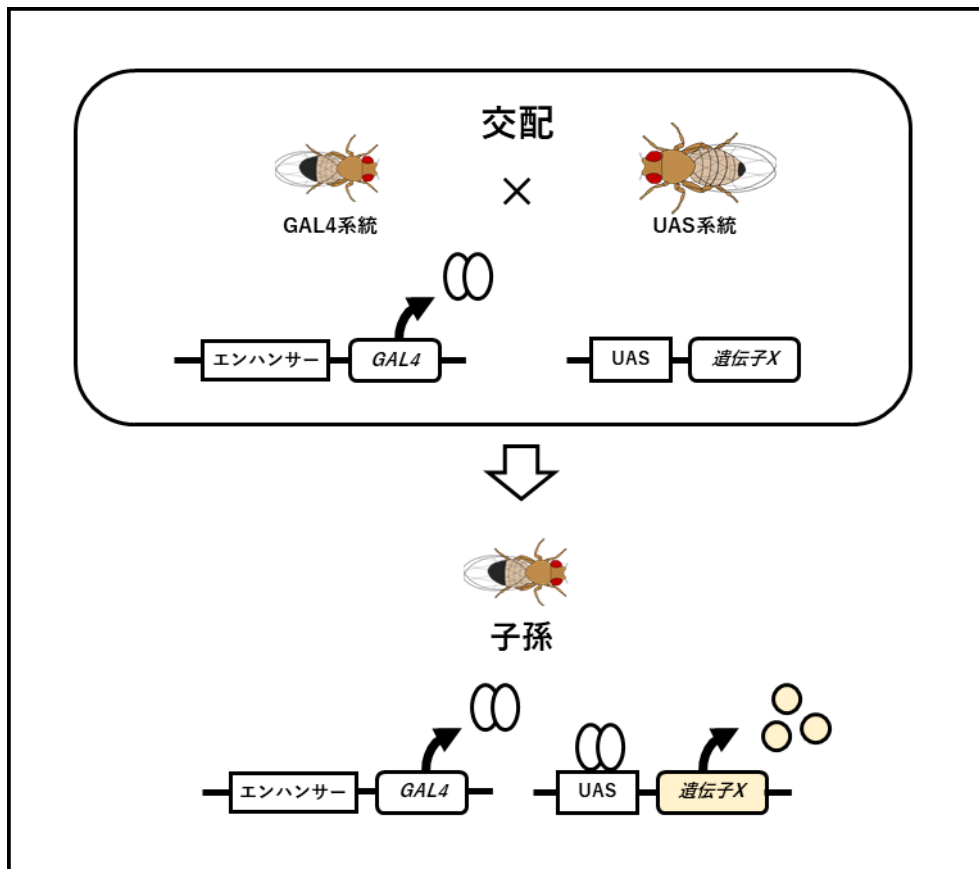


図 0-5. Gal4/UAS システム

Gal4/UAS システムの概念図である。Gal4 システムと UAS システムの成虫を交配すると、その子孫（F1）では、*gal4* 遺伝子と UAS 配列＋誘導遺伝子の両方を持ち、GAL4 タンパク質発現細胞でのみ UAS 配列下流の遺伝子発現を誘導することができる。

第1章：キイロショウジョウバエ時計細胞の網羅的機能解析

1.1. 要旨

動物の概日時計は、環境変化に適応をする上で重要な役割を果たしている。キイロショウジョウバエ（以下、ショウジョウバエ）は、朝方と夕方に顕著な活動ピークを示し、それぞれ朝方 (M)と夕方 (E)ピークとして知られている。これらのピークは、脳内にある2つの独立した振動体により制御されている。M、E ピークを制御する時計細胞を調べるために、細胞特異的な遺伝子発現システムである GAL4/UAS システムが使用されてきた。

本研究では、ショウジョウバエの M、E 振動体からなる、2 振動体モデルを再検討するために、50 種類以上の Gal4 システムと *UAS-period*¹⁶ システムを組み合わせた。これにより、*period* 突然変異体の遺伝的バックグラウンドで特定の細胞でのみ時計機能を回復することが可能となる。先行研究では、small ventrolateral neurons (s-LNv)が M ピークを制御するとされており、5th ventrolateral neuron (5th LNv)と 3 つの Cryptochrome (CRY)陽性の dorsolateral neurons (LNd)が E ピークを制御していると報告されている。さらに、posterior dorsal neurons 1 (DN1p)も M、E の振動体を含んでいると考えられている。本研究では、同じ時計細胞群を対象とする Gal4 システムが異なる結果を示す可能性があることが示され、活動パターンは多くの要因によって影響を受けることを示した。しかし、全体的な時計神経ネットワークが M、E ピークを制御すること、特に lateral neuron 群が主要な役割を果たしていることなど従来の研究結果を支持する結果が得られた。また、新たに 4~6 個の CRY 陽性 DN1p 細胞が M、E ピークを形成するために十分であること、そして DD 条件下で複雑なリズムを示すこと明らかにした。本研究で得られた詳細なスクリーニング結果は、*per* レスキュー実験を行う際に、最適な Gal4 システムの選択を行うためのカタログとして役立つ可能性がある。

1.2. 序論

概日時計は、動物種が進化の過程で獲得した適応メカニズムである。概日時計は、保存された遺伝子と分子メカニズムを利用しており、行動、生理、代謝など様々な生物活性にリズムを生み出している(Dunlap, 1999)。キイロショウジョウバエの先駆的な研究によって発見された *period (per)* 遺伝子は、依然として最も広く認識されている時計遺伝子である(Konopka & Benzer, 1971)。その後の詳細な研究により、ショウジョウバエ概日時計には多数の遺伝子が関与していることが明らかになった。具体的には、*period (per)*, *timeless (tim)*、*Clock*、*cycle* 遺伝子による負の転写翻訳ネガティブフィードバックループである(Hardin, 2005)。このフィードバックループは他の様々な転写因子や酵素とともに、*per* と *tim* の mRNA・タンパク質の量的変化を約 24 時間のリズムにする、概日時計の分子メカニズムである(Beer & Helfrich-Förster, 2020; King & Sehgal, 2020)。さらに、PER や TIM の周期的な分解などの翻訳後メカニズムも、時計タンパク質量の周期的な変化に寄与している(Brown et al., 2012)。従って、*per⁰¹* 突然変異体の遺伝的バックグラウンドにおいて、周期的な転写を行わないプロモーターを用いて *per* 遺伝子発現を誘導することでも、時計機能を回復することが可能である(Cheng & Hardin, 1998)。

ショウジョウバエの脳には概日リズムの分子メカニズムを有する約 150 個の時計細胞と呼ばれる神経細胞がある(Kaneko & Hall, 2000; Yoshii & Fukuda, 2023)。これらの神経細胞は、small ventrolateral neurons (s-LNv)、large ventrolateral neurons (l-LNv)、5th ventrolateral neuron (5th LNv、5th LN、5th s-LNv としても知られる) (Schubert et al., 2018)、dorsolateral neurons (LNd)、lateral posterior neurons (LPN)、anterior dorsal neurons 1 (DN1a)、posterior dorsal neurons 1 (DN1p)、dorsal neurons 2 (DN2)、dorsal neurons 3 (DN3)の 9 つの異なるグループに分類されている。DN1p、DN3 は、形態に基づいてさらに複数のサブグループに分類されている(Guo et al., 2018; Lamaze et al., 2018; Reinhard et al., 2022b; Sun et al., 2022)。

ショウジョウバエは明暗 (LD)条件下で朝方と夕方に 2 つの活動ピークを示し、これらは朝方 (M) ピークと夕方 (E) ピークとして知られている。また、その 2 つのピークは恒暗条件 (DD)でも自由継続リズムを示す(Helfrich-Förster, 2000)。これまでの研究から、s-LNv が M ピークと DD での自由継続リズムの形成に関与していることが示唆されており、5th LNv と LNd が E ピークを制御していることが示されている(Bachleitner et al., 2007; Grima et al., 2004; Helfrich-Förster, 1998; Lorber et al., 2022; Renn et al., 1999; Rieger et al., 2006; Shafer & Taghert, 2009; Stoleru et al., 2004; Yao & Shafer, 2014; Yao et al., 2016)。従って、これらはそれぞれ M 振動体と E 振動体と呼ばれている。また、光と温度条件が最適な場合に限定されるが、DN1p グループにも M 振動体と E 振動体が含まれており、M と E ピークの制御を行っている(Zhang et al., 2010b)。しかし、このショウジョウバエの 2 振動体モデルは単純化されすぎており、時計細胞間のネットワーク全体がリズムの形成に重要な役割を果たしていることを示す研究結果もある(Bulthuis et al., 2019; Chatterjee et al., 2018; Jaumouillé et al., 2021; Menegazzi et al., 2020; Sheeba et al., 2010)。例えば、CRISPR-Cas9 を利用した s-LNv や l-LNv における *per* または *tim* 遺伝子ノックアウト実験では、s-LNv 以外の時計細胞でも活動リズムを生み出すことが可能であることが示された(Delventhal et al., 2019; Schlichting et al., 2019)。

時計細胞の機能解析は、主に GAL4/UAS システムと呼ばれる細胞特異的な遺伝子発現システムを用いる(Brand & Perrimon, 1993)。ショウジョウバエ概日時計の研究分野では、*Pdf-Gal4* (s-LNv、l-LNv) (Menegazzi et al., 2020; Renn et al., 1999)、*R6-Gal4* (s-LNv) (Helfrich-Förster et al., 2007)、*c929-Gal4* (l-LNv) (Taghert et al., 2001)、*dvPdf-Gal4* (s-LNv、l-LNv、5th LNv、LNd) (Bahn et al., 2009)、*Mai179-Gal4* (s-LNv、5th LNv、LNd) (Grima et al., 2004; Menegazzi et al., 2020)、*Mai179-Gal4*、*Pdf-gal80* (5th LNv、LNd) (Menegazzi et al., 2020; Rieger et al., 2009)、*Clk4.1M-Gal4* (DN1p) (Menegazzi et al., 2020; Zhang et al., 2010b)などを用いることで、UAS プロモーターの制御下で特定の時計

細胞で遺伝子発現を誘導することができる。しかし、これらの Gal4 系統はすべての時計細胞群を網羅していないことに加えて、時計細胞以外での非特異的な発現や発現レベルが異なる。私はこれまでに時計細胞群で発現する 60 以上の Gal4 系統を特定してきた (Sekiguchi et al., 2020)。これにより、これらの Gal4 系統を用いて過去の研究結果をより詳細に検討することが可能になった。

これらの Gal4 系統も非特異的な発現を有しているため、UAS 系統は時計細胞特異的に影響を与える必要がある。そこで、*per*⁰¹ 突然変異体の遺伝的バックグラウンドで時計機能を回復させるために使用されてきた *UAS-per*¹⁶ 系統を選択した (Blanchardon et al., 2001; Cusumano et al., 2009; Grima et al., 2004; Menegazzi et al., 2020; Picot et al., 2009; Rieger et al., 2009)。時計遺伝子は時計細胞で特異的に発現するため、*per* は他の時計遺伝子と共発現した場合にのみ機能するはずである。従って、非時計細胞での PER タンパク質の異所発現は無視できる程度の影響であると考えられる。このような特定の脳領域で時計機能を回復させる実験は哺乳類でも行われており (Hughes et al., 2012)、これらの実験手法が種を超えて有効であることを示唆している。本研究では LD 条件下で 59 の Gal4 系統を用いて *per* レスキュー実験を行い、M と E ピークの予知行動への関与を評価した。時計機能の回復は、多くの系統で M ピークの予知行動にほとんど影響を与えないことがわかった。これは発現レベルの低さや遺伝的バックグラウンドの影響が主な原因だと考えられる。その一方で、過去の結果と一致する結果も得られている。また、一部の CRY 陽性 DN1p における時計機能の回復が、LD 条件下で正常な M、E ピークの形成、そして、完全ではないものの DD 条件下でのリズム形成が行えることを示した。

1.3 材料と方法

1.3.1 実験動物

実験で使用したショウジョウバエは、明期 12 時間：暗期 12 時間 (LD12:12)、25°C 条件下でショウジョウバエ飼育培地 (0.7% アガー、8.0% グルコース、3.3% 酵母、4.0% コーンミール、2.5% 小麦胚芽、0.25% プロピオン酸) で飼育した。本研究では、*white*¹¹¹⁸ (*w*¹¹¹⁸; Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) #5905) をコントロール系統として使用した。Gal4/UAS システムを用いて、*per*⁰¹ 突然変異体の時計細胞に *per* レスキューを行った。雌の *per*⁰¹;+;UAS-*per*¹⁶ (Blanchardon et al., 2001) を、それぞれの Gal4 系統の雄と交配させることで、次世代において特定の時計細胞でのみ時計機能が回復したショウジョウバエ *per*⁰¹/y;X-Gal4>UAS-*per*¹⁶ が生まれる。ネガティブコントロールとして、*per*⁰¹;+;UAS-*per*¹⁶ の雌ショウジョウバエを *w*¹¹¹⁸ の雄ショウジョウバエと交配させた。より詳細な解析では、*w*¹¹¹⁸ を用いて Gal4 系統に対して 6 回戻し交配を行うことで、遺伝的バックグラウンドの影響を排除した。

tim レスキュー実験では、*w*¹¹¹⁸;tim⁰¹;UAS-*tim*::*luc* の雌ショウジョウバエを *w*¹¹¹⁸;tim⁰¹;X-Gal4 の雄ショウジョウバエと交配させた。本研究で使用したすべての系統は、補足表 1 にまとめられている。

1.3.2 UAS-*tim*::*luc* の作製

所属研究室では、XLG-*luc* (Ralf Stanewsky 氏より寄贈) と pWALIU10-moe ベクター (RRID: DGRC_1470、Drosophila Genomics Resource Center) から UAS-*per*::*luciferase* (*luc*) ベクターを作製していた。そこで、*tim* の cDNA は TIM-*luc* ベクター (Patrick Emery 氏より寄贈) から以下のプライマーを用いて増幅した：フォワードプライマー (5'-GGGAATTGGGACAAAATGGACTGGTTACTAGCAAC-3')、リバープライマー (5'-GTTTTTGGCGTCTTCGTGATAGTGGGGCACCCG-3')。UAS-*per*::*luc* ベクターで行った

inverse PCR では、以下のプライマーを用いて増幅した：フォワードプライマー (5'-GAAGACGCCAAAAACATAAA-3')、リバープライマー (5'-TTTGTCCCAATTCCCTATTC-3')。 *tim* cDNA は In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Japan) を使用して *luc* を含む pWALIU10-moe ベクターにクローニングした。このコンストラクトの DNA 配列はシーケンスにより確認し、その後、ショウジョウバエ胚へのインジェクションに使用した (WellGenetics, Taiwan)。 *UAS-tim::luc* コンストラクトは、phiC31 site-directed integration を用いて第 3 染色体の attP2 サイトに挿入した。この研究では、 *UAS-tim::luc* 系統が *tim*⁰¹ 突然変異体の遺伝的バックグラウンドで *tim* 発現をレスキューするために使用されたが、ルシフェラーゼイメージングには使用していない。

1.3.3 活動リズムの測定とデータ解析

ショウジョウバエの活動を記録するために、生後 1-6 日以内の雄成虫を用いた。ショウジョウバエは、餌 (2%アガロースと 4%スクロース) が充填された活動記録用チューブに移した。その後、Drosophila Activity Monitor (DAM2; TriKinetics Inc., Waltham, MA, USA) に、挿入し、活動を記録した。活動記録の実験は、MIR-153 インキュベーター (PHCbi, Japan)を用いて温度を 20°Cに管理した。活動記録装置の上部には白色 LED を設置し、LC4 light controller (TriKinetics Inc.)で光制御を行った。光の強度は、100 lux (3.2 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)で実験を行った。初回のスクリーニングでは、LD12:12 条件下で少なくとも 7 日間、活動を記録した。戻し交配したショウジョウバエの活動は LD 条件下で 7 日間記録し、また特定の系統は LD 条件下で 6 日間記録した後、DD 条件下、20°C で 15 日間活動を記録した。

目視での観察では、ActogramJ (Schmid et al., 2011)を用いて生データをアクトグラムとして表示した。LD12:12 条件下における活動パターンを計算するために、個々のショウジョウバエの活動は Microsoft Excel で作成したマクロプログラムを用いて 30 分間隔で分析した(Gmeiner et al., 2013)。朝方 (M)と夕方 (E)の予知行動は、LD 期間の最後の 5 日間か

ら計算を行った。Harrisingh 指数の計算式は以下のように実施した：予知行動指数（予知行動をとれている程度を表す指標）＝（点灯または消灯 3 時間前の総活動量）/（点灯または消灯 6 時間前の総活動量）－ 0.5 (Harrisingh et al., 2007)。Fernandez 指数は、点灯または消灯の 4 時間の活動データに線形回帰の傾きを計算した(Fernandez et al., 2020)。

Harrisingh、Fernandez 指数の方法は、M と E の予知行動を客観的に判断する際に役に立つ。しかし、これらの方法では、解析の時間枠の外で現れる活動ピーク（例えば、点灯または消灯前にすでにピークが現れる場合や、点灯または消灯後に起こる場合）を認識することができない。そのため、さらにブラインドテストを追加し、それぞれのピークにおける予知行動を評価した。本研究では、三名の経験豊富な研究者が、ショウジョウバエの活動パターンから 2（強い）、1（弱い）、または 0（なし）のカテゴリでそれぞれの活動ピークにおける予知行動を評価した。インデックスの平均値が 1.33 を超えた場合、予知行動と評価した。DD 条件下における M、E 活動の有無も同様に、三名の研究者によりアクトグラムから評価した。ここでは、M、E の活動があるかどうかだけが判断された。評価が全員で一致した場合には 3 の値が与えられ、ピークが全く見られない場合には 0 が与えられた。最後に、系統ごとにすべての個体の M、E のピークの値を平均化し、グラフにプロットして結果をまとめた。

自由継続リズムの解析には、Lomb-Scragle periodogram (Actogram J)を使用した。ショウジョウバエは、概日リズムの範囲（16-30 時間）内で有意な自由継続リズムが 1 つだけ見られた場合は「強いリズム」、複数の自由継続リズムが存在する場合は「複雑なリズム」、概日リズムの範囲内で有意な周期性が見つからない場合は「無周期」とした。系統ごとに強いリズム、複雑なリズム、無周期の割合を求めた。さらに、リズムが認められた系統では、周期とリズム強度をそれぞれ箱ひげ図として示した。

1.3.4 統計解析

統計解析には、R (v4.2.2, R Core Team 2022)を使用し、RStudio (v2022.12.0.353, Posit team 2022)で実行した。Levene 検定は car パッケージ (v3.1-1, Fox & Weisberg, 2019)から使用した。その他のすべての統計処理は、R の基本パッケージ stats (v4.2.2)から使用した。データは Shapiro-Wilk 正規性検定 ($p > 0.05$)で正規分布を確認した。比較するデータセットのいずれかが正規分布でない場合、その比較のすべてのデータセットを正規分布でないとして扱った。非正規分布のデータには Mann-Whitney U 検定を、分散均質性がある場合 (Levene 検定、 $p > 0.05$)、t 検定を使用し、ない場合は Welch の t 検定を使用した。また、DD 条件下における強いリズム、複雑なリズム、無周期の分布について、異なる系統間での比較を行うために χ^2 検定を使用した。

1.3.5 抗体および免疫化学的手法

ショウジョウバエの雄は、少なくとも 3 日間、CN-40A (Mitsubishi, Tokyo, Japan)内で LD12:12 (光強度 100 lux)、20°C の環境に同調した。CRY タンパク質の免疫染色を実施する際には、DD 条件、20°C で 5 日間ショウジョウバエを維持した。これにより CRY が時計細胞に蓄積され、抗体で標識できるようになる。

ショウジョウバエを 4%パラホルムアルデヒドおよび 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)を用いて 2.5 時間、25°C で固定した。その後、固定したハエを PBS で 3 回洗浄し、解剖により脳を取り出し、PBS に 0.5% Triton X-100 (PBS-T)を含む溶液で 3 回洗浄した。次に、PBS-T (5%正常ロバ血清を含む) 溶液を用いて 1 時間、25°C でブロッキングし、1 次抗体で 72 時間、4°C でインキュベートした。インキュベーション後、脳を PBS-T で 6 回洗浄し、2 次抗体を用いて 3 時間、25°C インキュベートした。最後に、PBS-T で 6 回洗浄し、Vectashield mounting medium で封入した (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)。使用した 1 次抗体は、抗 Green fluorescent protein

(GFP)抗体 (ニワトリ由来 1:1000; Rockland, Limerick, PA, USA)、抗 CRY 抗体 (ウサギ由来 1:15000) (Yoshii et al., 2008)、抗 PER 抗体 (ヤギ由来 1:1000; Sc-15720, SANTA CRUZ Biotechnology, TX, USA)。また、以下の蛍光標識 2 次抗体を 1:500 の濃度で使用した。Alexa Fluor® 488 nm (ヤギ由来 抗ニワトリ抗体)、Alexa Fluor™ Plus 488 nm (ロバ由来 抗ヤギ抗体)、555 nm (ロバ由来 抗ウサギ抗体) (Life Technologies, CA, USA)。

染色されたサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 Olympus FV3000 (Olympus、Tokyo、Japan)で撮影を行った。PER 免疫染色の定量化には、実験全体を通じて共焦点顕微鏡の設定を一定に保ち、Fiji ソフトウェアを使用し、先行研究と同様の方法で蛍光輝度の定量を行った(Schindelin et al., 2012; Yoshii et al., 2009)。

1.4. 結果

1.4.1 *per* レスキュー系統を利用した時計機能の評価

per レスキュー系統を利用した 1 回目のスクリーニングでは、すべての時計細胞に対して *per* レスキューを行える *tim(UAS)-Gal4* をポジティブコントロールとし、*per⁰¹;;UAS-per¹⁶/+*系統をネガティブコントロールとした。実験群として 54 種類の Gal4 系統を用いて *per* レスキューを行った(図 1A, 補足図 1, 2)。

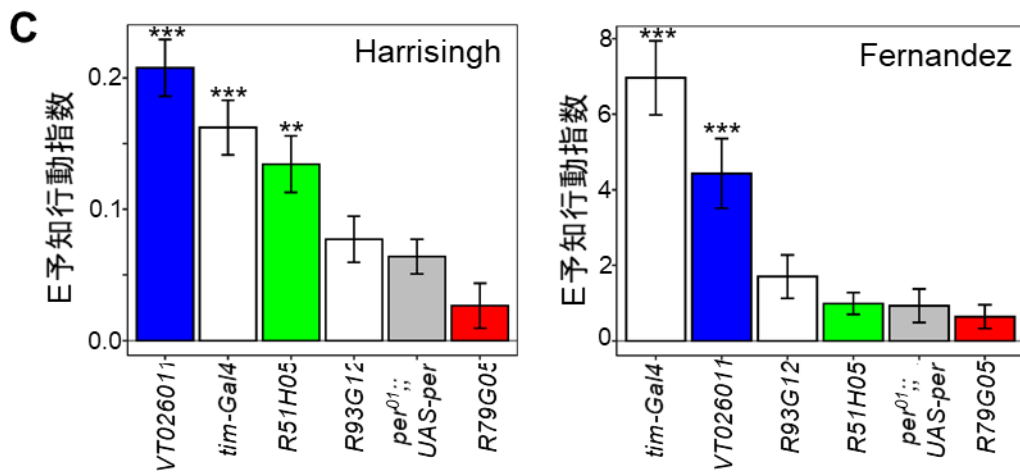
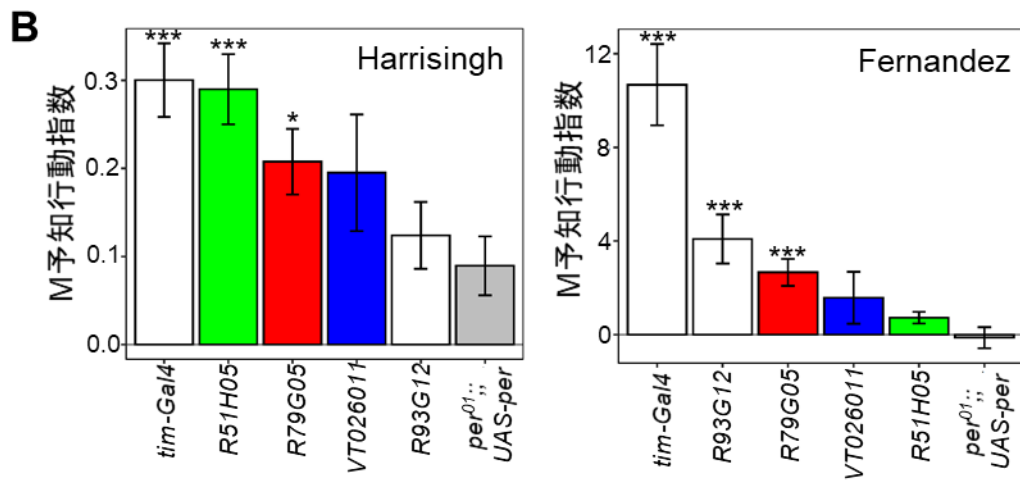
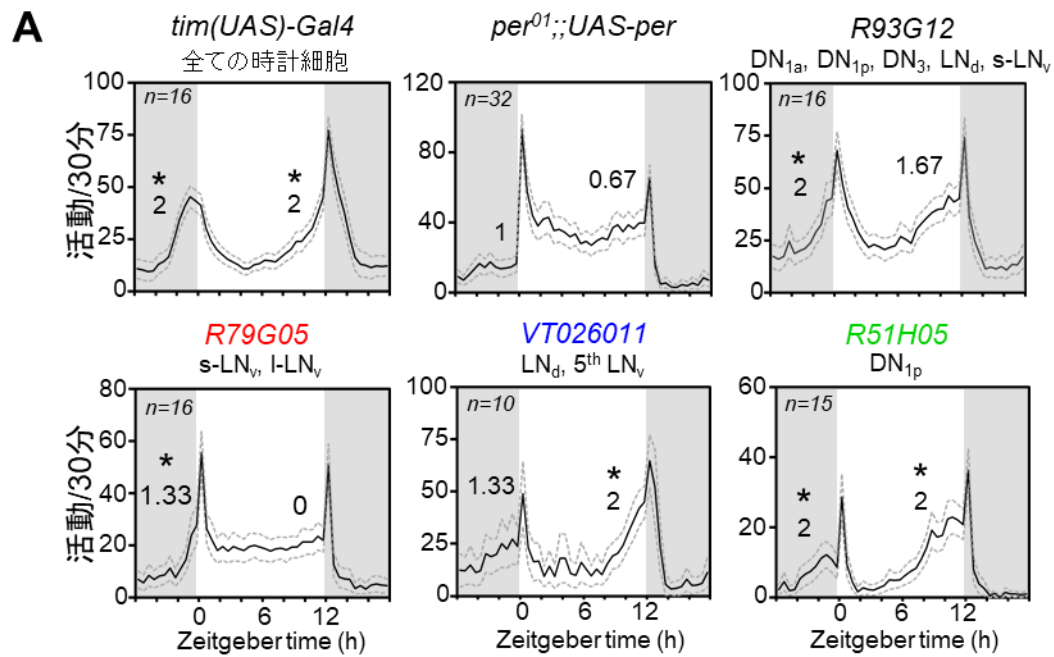


図 1

(A) LD、20°C条件下における *per* レスキュー系統の活動パターン（平均±標準誤差）。

tim(UAS)-Gal4 をポジティブコントロールとし、*per⁰¹::uas-per¹⁶/+*をネガティブコントロールとした。グラフ上の数字は、ブラインドテストで評価した各ピークのスコアを示している。スコア>1.33 の場合、予知行動と評価した。アスタリスクは Harrisingh 指数、

Fernandez 指数のいずれかで有意な予知行動と評価されたピークを示している。(B) 朝方の予知行動指数は、Harrisingh 指数（左）、Fernandez 指数（右）で計算した。(C) 夕方の予知行動指数は、Harrisingh 指数（左）、Fernandez 指数（右）で計算した。アスタリスクは、ネガティブコントロールと比較して有意差があることを示している。（* = p

<0.05, ** = p < 0.01, *** p < 0.001)

M、E の予知行動の解析には、よく利用されている Harrisingh 指数(Harrisingh et al., 2007) と Fernandez 指数(Fernandez et al., 2020)を用いた。ほとんどの *per* レスキュー系統では、ネガティブコントロールと比べて M と E の予知行動に差が見られず、活動量は系統ごとに異なっていた(補足図 1, 2)。M の予知行動は、54 系統の *per* レスキューの内、Harrisingh 指数で 45 系統、Fernandez 指数で 38 系統がネガティブコントロールとの間で有意な差がみられなかった。また、E の予知行動は、Harrisingh 指数で 43 系統、Fernandez 指数で 49 系統がネガティブコントロールとの間で有意な差がみられなかった。以上のことから、Harrisingh 指数では、Fernandez 指数と比べて有意な E の予知行動指数を示す系統が多く、Fernandez 指数は Harrisingh 指数と比べて有意な M の予知行動指数を示す系統が多いことがわかった(補足図 2)。E 細胞でのみ *per* をレスキューした系統 (VT026011-Gal4)は、ネガティブコントロールと比べて E ピークが有意に高いことを示した(図 1, 補足図 2 の青)。また、M 細胞で *per* をレスキューした系統 (R79G05-Gal4) や Pdf-Gal4 で *per* をレスキューした場合も、M ピークが高いことを示した(図 1, 補足図 2 の赤)。さらに、DN1p で *per* をレスキューした系統 (R51H05-Gal4)は、Harrisingh 指数とブラインドテストで判定した場合には M と E のピークの増加を示したが、Fernandez 指数では示さなかった(図 1, 補足図 2 の緑)。対照的に、別の DN1p 系統 (R20A02-Gal4)での *per* レスキューは、Fernandez 指数で計算した場合には M、E ピークの有意な増加を示したが、Harrisingh 指数では示さなかった(補足図 1, 2)。これは、予知行動の判定方法によって異なる結果をもたらすことを示している。

per レスキュー系統間での違いが遺伝的バックグラウンドの影響である可能性を考え、34 種類の Gal4 系統を *w¹¹¹⁸* と戻し交配し、再度実験を行った。また、Clk856-Gal4 (全ての時計細胞、一部の DN3 を除く)、R14F03-Gal4 (全ての時計細胞)、dvPdf (s-LNV、l-LNV、5th LNV、LNd)、R23E05-Gal4 (DN1a)、R67D09-Gal4 (l-LNV)の 5 つの Gal4 系統を新たに加えた。この実験では、GAL4 発現が *tim(UAS)-Gal4* 系統よりも時計細胞に限定さ

れている *Clk856-Gal4* 系統をポジティブコントロールとした。戻し交配後では、すべての系統の活動レベルがより高く、系統間で活動量が安定していた（補足図 3）。また、予知行動の解析においても、Harrisingh 指数、Fernandez 指数の予知行動指数が増加した。M の予知行動は、34 系統の *per* レスキュー系統のうち、Harrisingh 指数では 26 系統、Fernandez 指数では 16 系統がネガティブコントロールとの間に有意な差がみられなかった。一方で、Harrisingh 指数と Fernandez 指数の両方で、26 系統がネガティブコントロールとの間に有意な差がみられなかった。*VT055852-Gal4* 系統 (DN1a、DN1p、LNd) は、戻し交配後に M、E ピークの予知行動が改善した（図 2）。

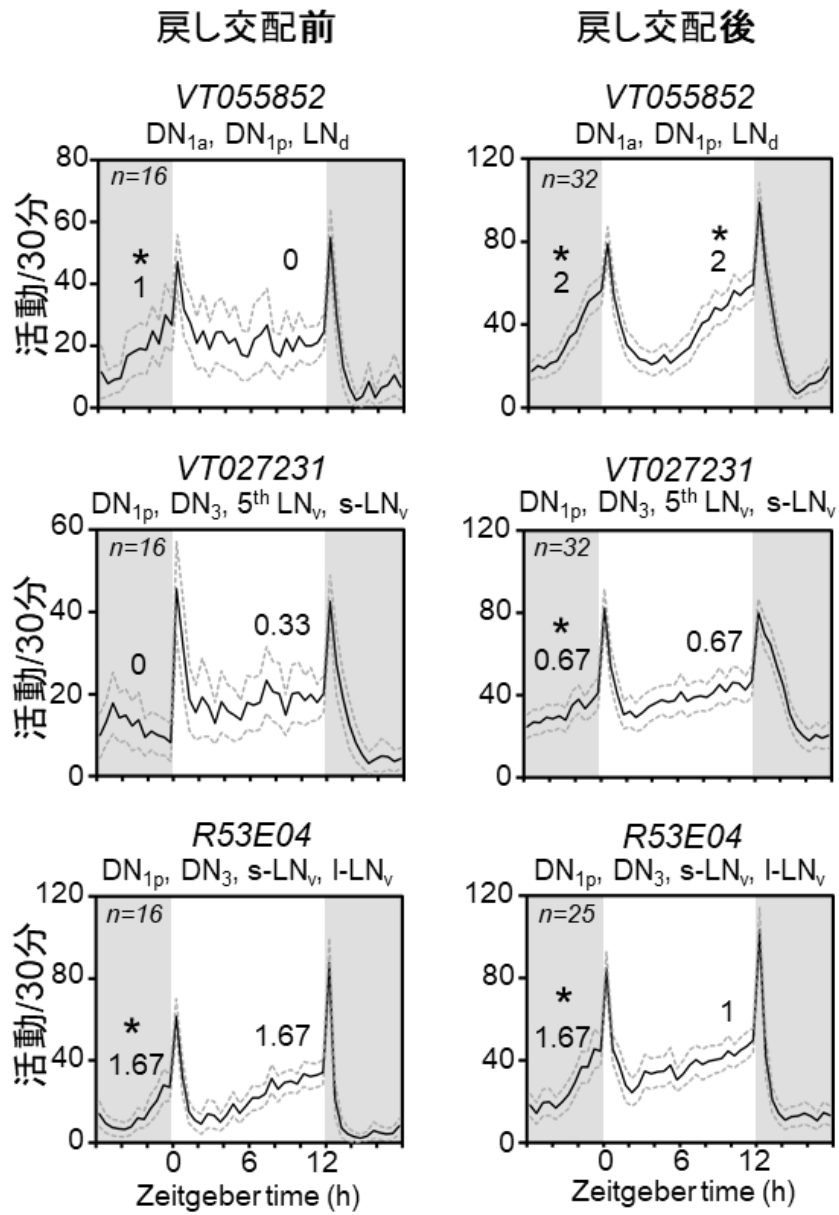


図 2

戻し交配前（左）、戻し交配後（右）の代表的な *per* レスキュー系統の活動パターン（平均±標準誤差）。活動記録は、LD、20°C 条件下で行われた。活動パターンのラベルは図 1 と同じである。

しかし、広範囲の時計細胞に *per* レスキューを行える *VT027231-Gal4* 系統 (DN1p、DN3、5th LNV、s-LNV) のような系統でも、両方の活動ピークが観察されないケースも見受けられた (図 2, 補足図 2, 3)。また、*R53E04-Gal4* 系統 (DN1p、DN3、s-LNV、l-LNV) では、ブラインドテストで戻し交配前に予知行動として E ピークが現れていたが、戻し交配後は E ピークが不明瞭になっていた (図 2, 3)。同様に、*Pdf-Gal4* での *per* レスキューは、戻し交配前ではどちらの方法を用いても、ネガティブコントロールとの間に有意な M の予知行動指数を示した (補足図 1, 2)。しかし、戻し交配後は Harris Singh 指数ではレスキューを示さず、Fernandez 指数でも値が低下した (図 3, 補足図 3)。

図 3

Harrisingh、Fernandez 指数を用いて、34 種類の Gal4 系統 (w^{1118} で戻し交配後) とポジティブコントロール (w^{1118})、ネガティブコントロール ($per^{01};;uas-per^{16}/+$) の A 朝方 (M)、B 夕方 (E) の予知行動指数を算出した。それぞれの棒グラフは平均 $\pm$ 標準誤差を表している。ネガティブコントロールは灰色と矢印で示している。M 細胞で *per* をレスキューした系統は赤、E 細胞で *per* をレスキューした系統は青、DN1p で *per* をレスキューした系統は緑で示している。アスタリスクはネガティブコントロールと比較して有意差があることを示す (** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$)。グラフ内にある点は、ブラインドテストで評価した M、E ピークの有意性を示す (点 1 つ: 1.67、点 2 つ: 2.00)。

また、M の予知行動指数は、ポジティブコントロールである w^{1118} とネガティブコントロールの間に、差がみられなかった（図 3）。ただし、この系統はブラインドテストで評価した際に光が点灯する前に活動が増加していることが観察されている（図 3, 補足図 3）。同様に、M 細胞でのみ *per* レスキューを行える *R61G12-Gal4* 系統は、すべての評価方法においてネガティブコントロールと同じであったが（補足図 1, 2）、戻し交配後は Fernandez 指数でのみネガティブコントロールと異なるという結果になった（図 3, 6, 補足図 3）。対照的に、*R14F03-Gal4*（全ての時計細胞）での *per* レスキューは、すべての評価方法において有意な M ピークを示し、ブラインドテストで有意な E ピークも示した（図 3）。これらのことから、戻し交配は基本的には安定した結果につながるものの、系統や解析方法に依存してその効果に差があることがわかった。特に、ネガティブコントロールは、光が点灯する前から活動しているため、M 活動の評価は困難であることが明らかになった（図 1A）。

1.4.2 類似した系統での *per* レスキューが異なる結果を示す

per レスキュー系統における PER タンパク質の振動は、使用した Gal4 系統の転写活性レベルに依存している。従って、同一の細胞で *per* レスキューを行った場合でも、異なる行動パターンにつながる可能性が考えられる。そのため、使用した系統の中で同じ GAL4 発現を示し、異なる行動パターンを示す 2 つの *per* レスキュー系統 (*VT026011-Gal4* と *R18F07-Gal4*)についてより詳細な検証を実施した。これらの系統では、同じ LNd 3 つと 5th LNV で *per* 発現を誘導できるが(Sekiguchi et al., 2020)、E ピークは *VT026011-Gal4* でのみ観察され、*R18F07-Gal4* ではみられなかった（図 4A, B）。

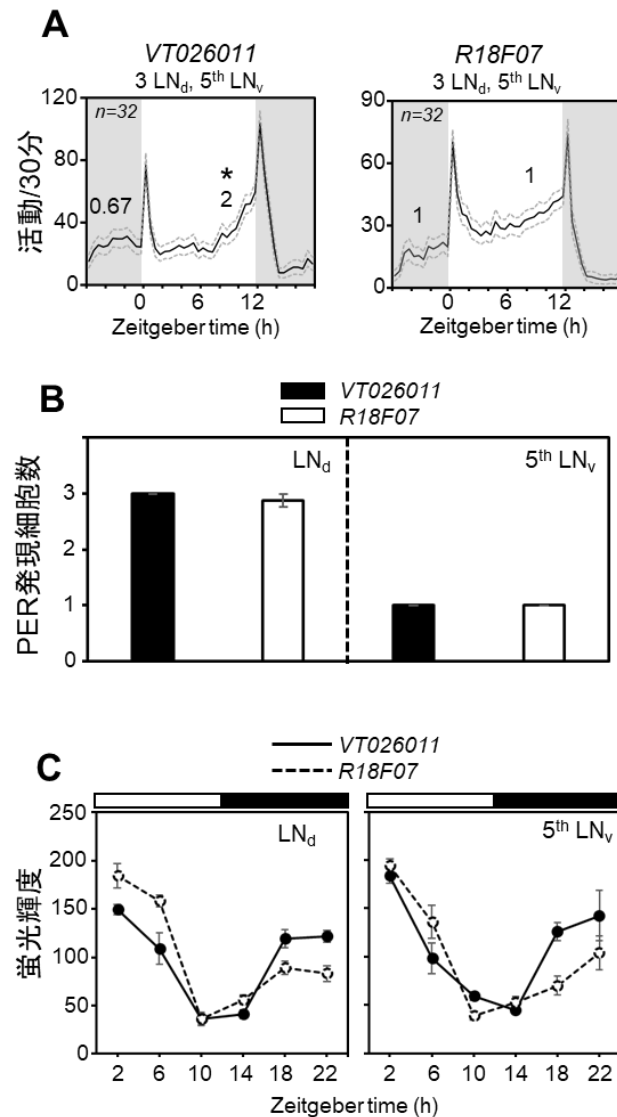


図 4

(A) LD、20℃条件下における *per* レスキュー系統の活動パターン（平均±標準誤差）。

VT026011-Gal4 と *R18F07-Gal4* は、時計細胞における *Gal4* 発現パターンが類似しているが、活動パターンは異なる系統である。(B) *VT026011-Gal4* と *R18F07-Gal4* 系統における PER 発現細胞の数。どちらの系統も 3 つの LN_d と 1 つの 5th LN_v で PER を発現する。(C) LD、20℃条件下での *VT026011-Gal4* と *R18F07-Gal4* 系統の PER 発現リズム。各タイムポイントにつき 8 つの脳を用いた。活動パターンのラベルは図 1 と同様である。

そこで、LD12:12 条件下における、LNd と 5th LNV の PER 発現量を 4 時間ごとに測定した。その結果、どちらの系統でも有意な PER 発現リズムが観察された（図 4C）。このことから、系統間の未知の遺伝的な違いが E ピークの有無に影響を与えている。

次に、*tim*⁰¹ 突然変異体の遺伝的バックグラウンドにおいて *UAS-tim::luc* 系統を使用した *tim* レスキュー実験を行なった。*R14F03-Gal4*（全ての時計細胞）を用いた *tim* レスキュー系統では、M、E ピークが回復した（図 5）。

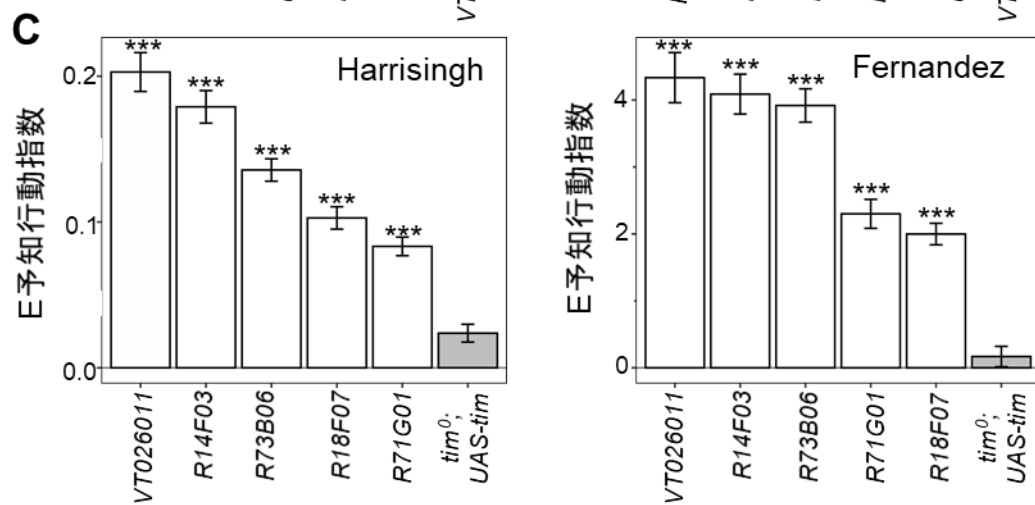
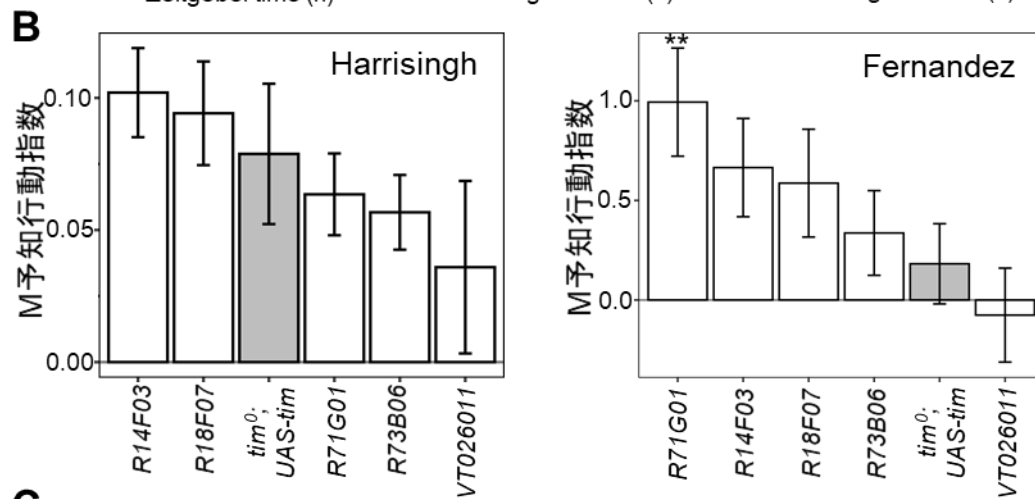
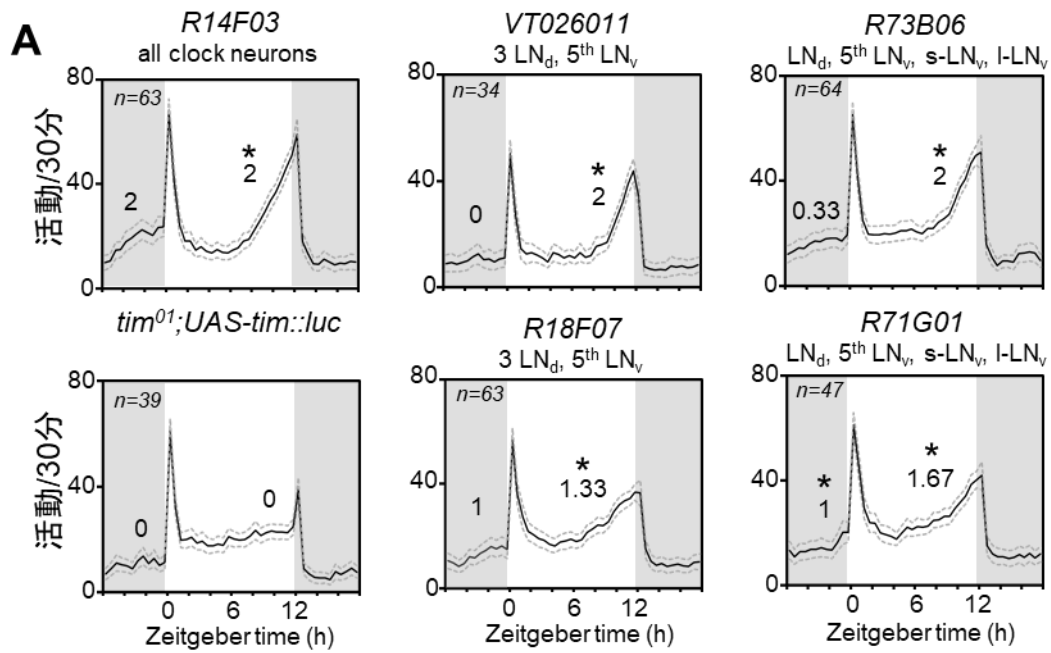


図 5

(A) LD、20°C条件下における *tim* レスキュー系統の活動パターン（平均±標準誤差）。

R14F03-Gal4 をポジティブコントロールとし、*w¹¹¹⁸;tim⁰¹::luc/+*をネガティブコントロールとした。(B, C) 朝方の予知行動指数は、Harrisingh 指数（左）、Fernandez 指数（右）で計算した。グラフのラベルは図 1 と同様である。

従って、*tim* レスキューが正常に働くことが示された。そこで、*VT026011-Gal4* および *R18F07-Gal4* を用いた *tim* レスキューを行なった。その結果、*VT026011-Gal4* では明確な E ピークがみられたが、*R18F07-Gal4* では僅かな回復しかみられなかった（図 4）。これは、*per* レスキュー実験と類似した結果である。次に、M と E 細胞に対して *tim* レスキューを行える、*R73B06-Gal4* (LNd、5th LNV、s-LNV、l-LNV)、*R71G01-Gal4* (LNd、5th LNV、s-LNV、l-LNV) 系統を用いてレスキュー実験を行った。その結果、*R73B06-Gal4* を用いた *per* または *tim* レスキュー系統では、E ピークのみ確認できた。一方、*R71G01-Gal4* では *per* レスキュー時には、M ピークのみ回復したが、*tim* レスキュー時には、M と E 両方のピークが回復した（図 3, 5）。従って、同じ時計細胞で時計機能が回復しても、使用する系統やレスキューする遺伝子によって結果が異なる可能性が示唆された。

1.4.3 M 細胞と E 細胞

先行研究では、s-LNV (M 細胞) は M 活動を、LNd や 5th LNV (E 細胞) は、E 活動の制御を担っていることが示されている (Yoshii et al., 2023)。しかし、M 細胞のみでの *per* レスキューでは、必ずしも M ピークが回復するわけではなかった。*R61G12-Gal4* (s-LNV, l-LNV)、*Pdf-Gal4* (s-LNV, l-LNV) は、Fernandez 指数を用いた場合において予知行動が回復したという評価が得られた（図 3）。一方で、*VT027163-Gal4* (s-LNV) では、どの定量方法であっても予知行動の回復はみられなかった（図 6）。

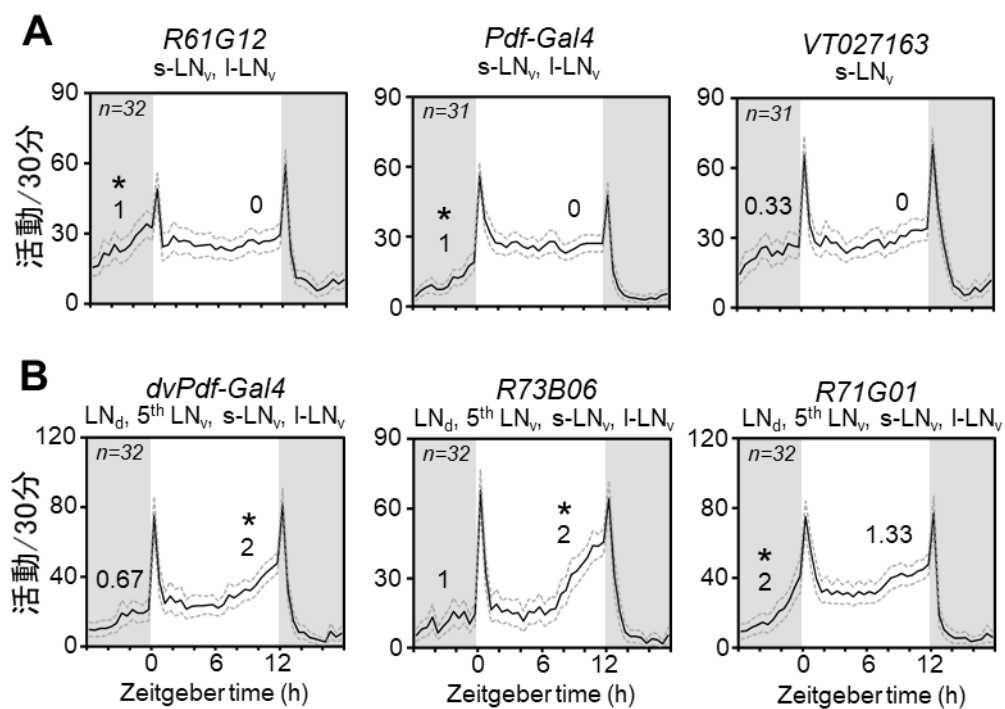


図 6

(A) LD、20℃条件下における M 細胞に対する *per* レスキューを行なった 3 系統の活動パターン（平均±標準誤差）。(B) LD、20℃条件下における M、E 細胞に対する *per* レスキューを行なった 3 系統の活動パターン（平均±標準誤差）。グラフのラベルは図 1 と同様である。

VT026011-Gal4 (LNd, 5th LNV)、*dvPdf-Gal4* (LNd, s-LNV, l-LNV, 5th LNV)、*R73B06-Gal4* (LNd, s-LNV, l-LNV, 5th LNV)は E 細胞、または M と E 細胞に対する時計機能の回復を行えるが、E ピークのみ回復した (図 3, 6)。従って、*per* レスキューでは、M 細胞に比べて E 細胞の機能回復が容易であることが示された。一方、*R71G01-Gal4* (LNd, 5th LNV, s-LNV, l-LNV)、*R15C11-Gal4* (LNd)系統による *per* レスキューでは、M ピークのみが回復したことから、系統依存的な表現型である可能性も考えられる (図 3, 6)。

1.4.4 DN1p は M、E 振動体を含む時計細胞群である

DN1p 特異的な *Gal4* 系統である *R51H05-Gal4*、*R79A11-Gal4*、*VT063307-Gal4* は、ブラインドテストで評価した場合、M、E 両方の予知行動が回復した (図 7)。これらの結果は、DN1p が M、E 細胞を含んでいることを示唆する先行研究結果と一致している (Chatterjee et al., 2018; Zhang et al., 2010b)。*Clk4.1M-Gal4* 系統は、DN1p 特異的な *Gal4* 系統として頻繁に利用されており、先行研究では、明確な予知行動の回復がみられていた (Chatterjee et al., 2018; Zhang et al., 2010a; Zhang et al., 2010b)。しかし、本研究では、M、E どちらの予知行動も回復しなかった。これは、先行研究(Chatterjee et al., 2018; Zhang et al., 2010b)より高い光強度 (100lux)で実験を実施していたことが原因かもしれない。また、DN1p 特異的な *R56H10-Gal4*、*R91F02-Gal4*、*R55E06-Gal4* 系統も *Clk4.1M-Gal4* 同様、いずれの予知行動も回復しなかった (図 3)。一方で、DN1p に加えて、他の時計で *per* レスキューを行える系統である、*R18H11-Gal4* (DN1a, DN1p, LNd)、*VT002080-Gal4* (DN1p, DN2)、*VT055852-Gal4* (DN1a, DN1, LNd)では M、E の予知行動が回復した (図 3, 7)。従って、DN1p のみで M、E ピークの形成は十分できるものの、系統によって結果が異なることがわかった。

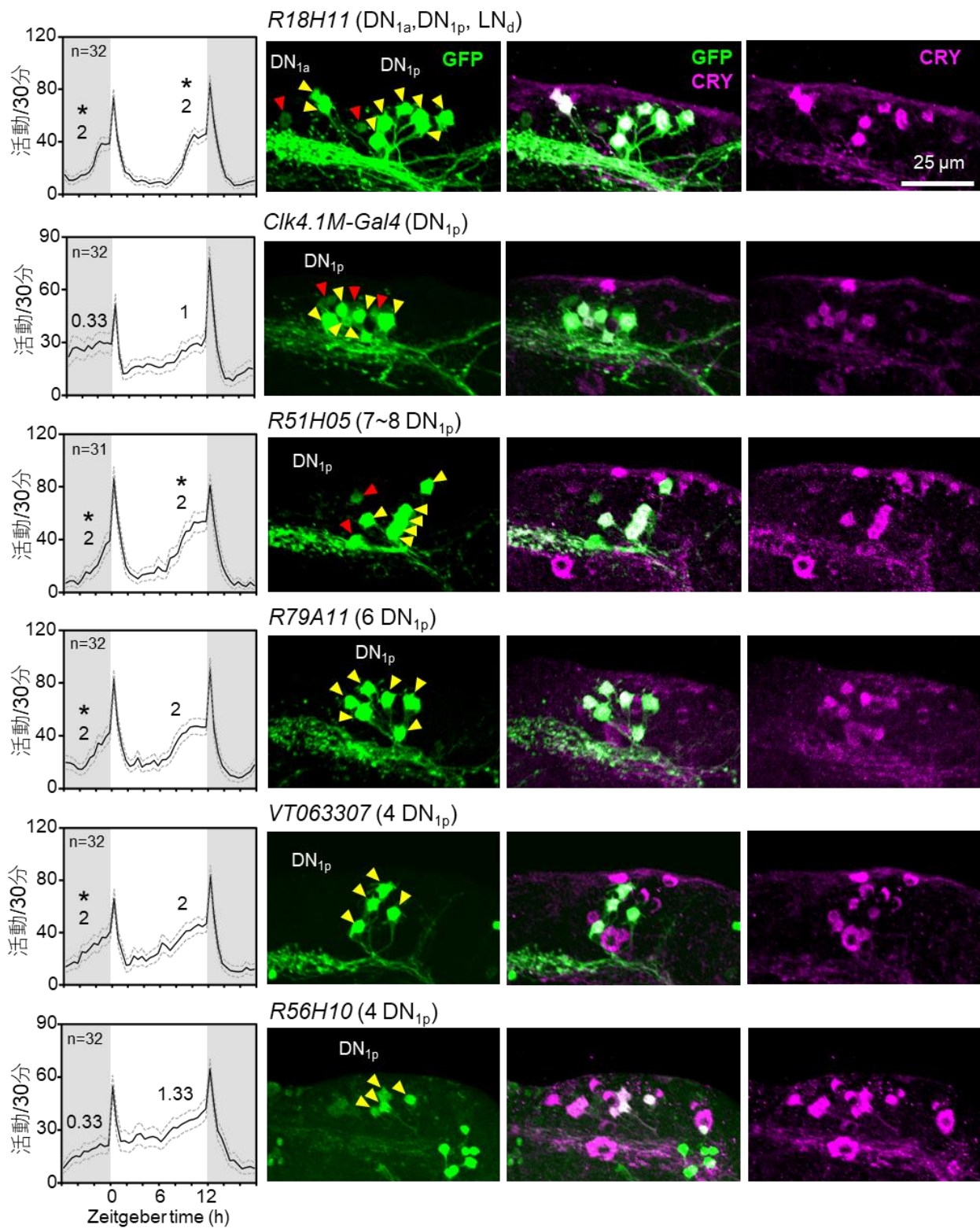


図 7

(A) LD、20°C条件下における DN1p に対する *per* レスキューを行なった 6 系統の活動パターン（平均±標準誤差）。これらの *Gal4* 系統は、それぞれ *UAS-GFP* 系統と交配し、*GAL4* 発現を可視化した。ショウジョウバエの脳は、抗 GFP 抗体（緑）と抗 CRY 抗体（マゼンタ）で染色した。黄色の矢頭は CRY 陽性 DN1p を示し、赤色の矢頭は CRY 陰性 DN1p を示す。グラフのラベルは図 1 と同様である。

Chatterjee らは、CRY 陽性 DN1p の一部が M ピークの制御を担い、CRY 陰性 DN1p が E ピークの制御を担っていると報告した(Chatterjee et al., 2018)。そこで、M、E の予知行動を明確にレスキューする *R51H05-Gal4*、*R79A11-Gal4*、*VT063307-Gal4* 系統における CRY 発現パターンを調べるため、CRY タンパク質の染色を実施した。その結果、*R51H05-Gal4* では、7~8 個の DN1p が GAL4 発現を示し、そのうち 6~7 個が CRY 陽性であった (図 7)。*R79A11-Gal4* では 6 個、*VT063307-Gal4* では 4 個の DN1p が GAL4 発現を示し、すべてが CRY 陽性であった。従って、4 つの DN1p が M、E の予知行動の形成に十分である。対照的に、*R56H10-Gal4* は LD 条件下において M、E ピークを示さなかった (図 3, 7)。この系統では、GAL4 が 4 つの CRY 陽性 DN1p で発現していたものの、その発現は弱いように見える (図 7)。以上のことから、4 つの CRY 陽性 DN1p は、GAL4 発現が十分に強ければ M、E ピークを形成できることを示した。

1.4.5 恒暗条件下 (DD) におけるリズムと M・E 予知行動の回復

次に、*per* レスキュー系統の活動を DD 条件下で最大 3 週間記録し、自由継続リズムの形成にそれぞれの時計細胞がどのような影響を与えているのかを調べた。その結果、ポジティブコントロール (*w¹¹¹⁸*)では、LD 条件下で示す M、E 活動が DD 条件下でも継続していた (図 8)。一方、ネガティブコントロール (*per⁰¹::UAS-per¹⁶/+*)では、DD 移行後に M、E ピークは失われ、リズムの消失、または複雑なリズムを示した (図 8, 9)。DD 条件下における自由継続リズムの解析では、ポジティブコントロールにおいて約 24 時間のリズムが確認された (図 8, 10)。一方、ネガティブコントロールでは 10 時間から 36 時間の範囲のリズムが確認されたが、そのリズムの強度は弱い、または無いことがわかった (図 9, 10)。ほぼすべての時計細胞で *per* 発現を誘導する Gal4 系統 (*Clk856-Gal4*; *R14F03-Gal4*; *VT039429-Gal4*; *R93G12-Gal4*) では、DD 条件下における自由継続リズムと M、E ピークを有意に回復したものの、系統によりその程度は異なることがわかった

(図 8, 10)。この 4 系統の中では、*Clk856-Gal4* で最もよくレスキューがみられ、*R93G12-Gal4*、*R14F03-Gal4*、*VT039429-Gal4* の順にレスキューの程度は弱くなっている (図 10)。*VT039429-Gal4* は、s-LNv での *per* 発現がない唯一の系統であることから、この細胞が DD 条件下におけるリズム形成に重要であることを示した。また、*Pdf-Gal4* による M 細胞のみでの *per* レスキューは、約 24 時間の周期をもつ明確な概日リズムを示した (図 8, 10)。M、E ピークの評価では、常に M ピークが存在し、多くのアクトグラムでは E ピークも検出された (図 8 左の *Pdf-Gal4;UAS-per¹⁶* のアクトグラムの矢印；図 10D の E ピークの列)。他の 2 つの *Gal4* 系統 (*R61G12-Gal4*、*VT027163-Gal4*) を用いた M 細胞での *per* レスキューでは、自由継続リズムが *Pdf-Gal4* のように回復しなかった (図 10)。これは、LD 条件下での M ピークが十分に回復しなかったことと一致している (図 3)。*VT026011-Gal4* を用いた E 細胞のみ (5th LNv, LNd) の *per* レスキューは、約半数の個体で弱い自由継続リズムを示した (図 8, 10)。また、そのリズムは多くの場合 LD 条件下でみられた E ピークから始まっていた。

数個の DN1p において *per* をレスキューした系統が LD 条件下で明確な M、E ピークを示した (図 7)。このことから、これらの系統が DD 条件下でも M、E ピークをもつ強度の高い自由継続リズムを示す可能性が考えられた。そこで、これらの系統の DD 条件下における活動を解析したところ、ほとんどの個体は複雑なリズムを示した (図 9, 10)。強いリズムを持つ少数の個体は DD 移行後も明確な M、E 活動がみられた。また、複雑なリズムをもった個体でも、DD 移行直後、または数日は、M、E 活動が確認できた (図 9 の矢印参照)。すべての DN1p レスキュー系統の中で、DD 条件下で最もよくレスキューができた系統は、*R18H11-Gal4* であった。しかし、この系統は DN1a や LNd (少なくとも 1 つ) にも *per* をレスキューしている。従って、DN1p 以外の時計細胞の影響があることは否定できない。以上のことから CRY 陽性 DN1p は、自由継続リズムをある程度形成できる M、E 振動体を含んでいると考えられる。

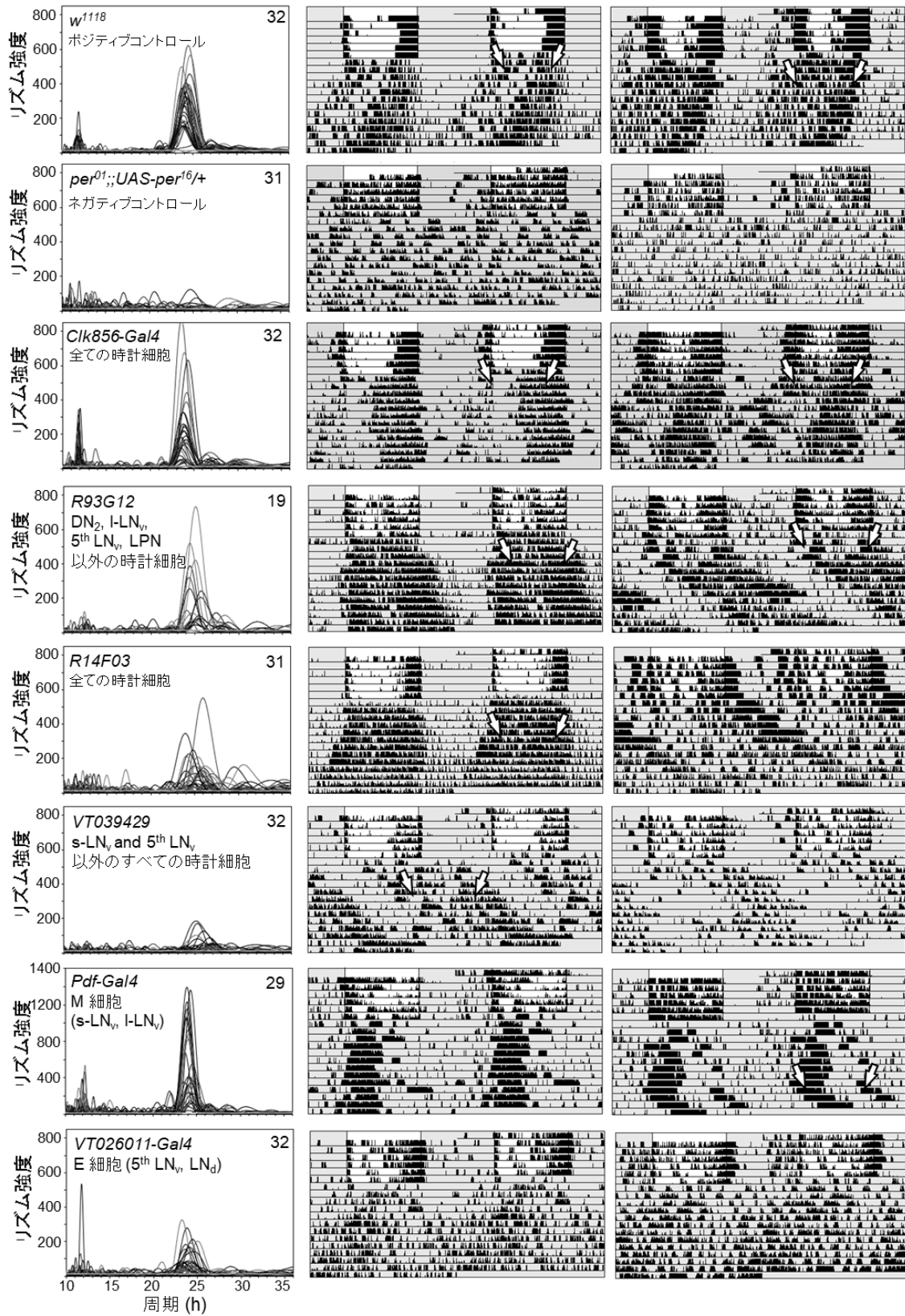


図 8

ほぼ全ての時計細胞、または、M、E細胞に対する *per* レスキュー系統のピリオドグラムと代表的なアクトグラム。ショウジョウバエは LD 条件下で 6 日活動を記録し、その後 DD 条件下で 13 日活動を記録した。灰色の背景は暗期を示す。ピリオドグラムは系統ごとに全ての個体データを重ねて表示し、周期と強度の分布を示している。ピリオドグラムの右上には個体数を示している。アクトグラム上の矢印は、ブラインドテストによって評価した M、E の活動を示している。ネガティブコントロール (*per⁰¹::UAS-per¹⁶/+*) には、無周期個体 2 匹を示している。無周期個体の朝方の活動は光が点灯する前から始まっている。

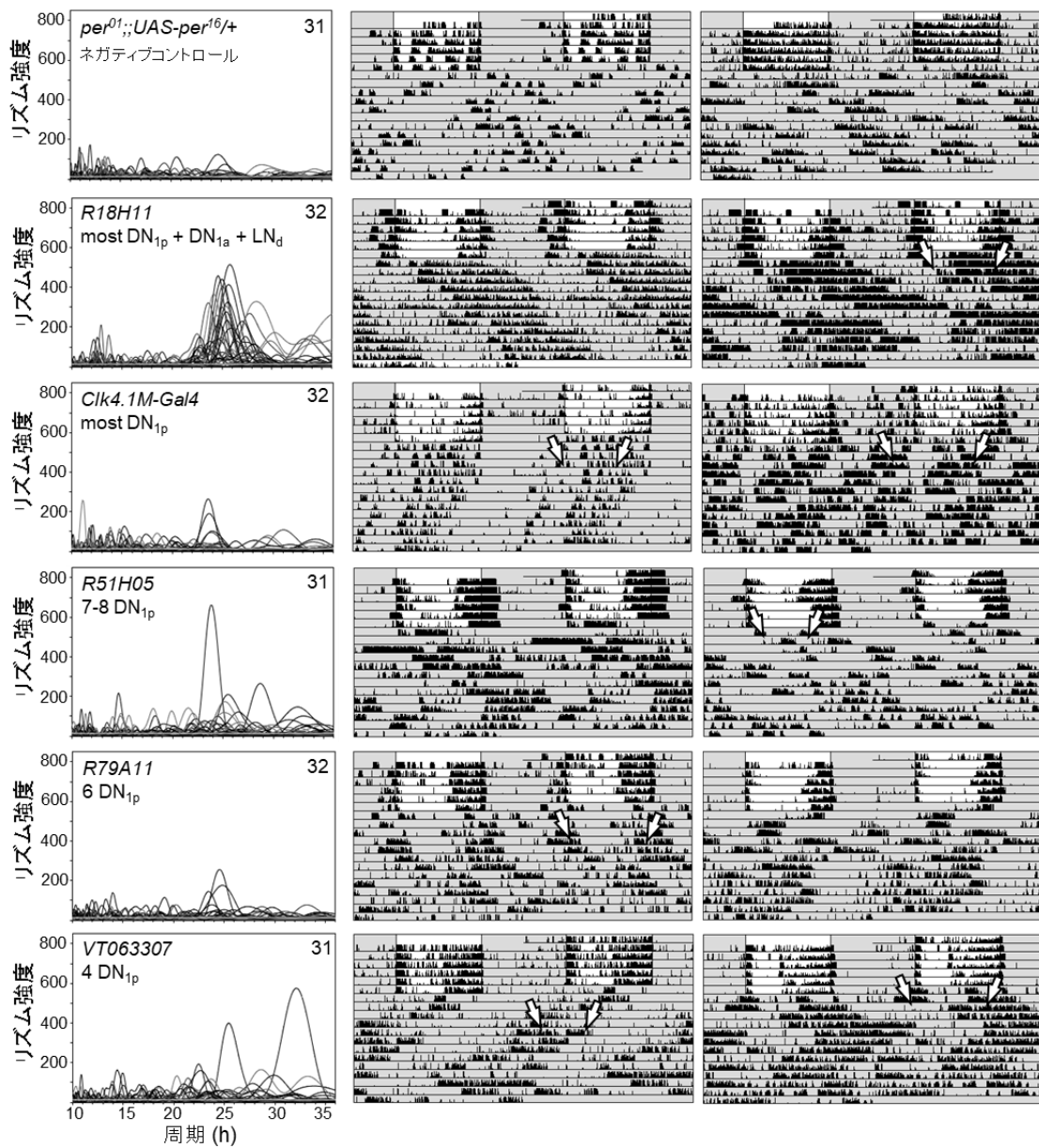


図 9

DN1p に対する *per* レスキュー系統のピリオドグラムと代表的なアクトグラム。グラフのラベルは図 8 と同様である。ネガティブコントロール (*per⁰¹::UAS-per⁴⁶/+*) では、2 匹の複雑なリズムをもつショウジョウバエを示している。他の遺伝子型とは異なり、ネガティブコントロールでは明確な M および E 活動はみられなかった。*R18H11-Gal4* では、s-LNv における PER と発現がないのにもかかわらず、自由継続リズムの回復がみられた。E 細胞 (3 つの LNd、5th LNv) での *per* レスキュー結果では、E の予知行動の回復は弱いため、1 つの PER 陽性の LNd がこのリズムを引き起こすとは考えにくい (図 8 参照)。また、DN1p も DD 条件下での自由継続リズムの回復はできなかった。従って、DN1a が *R18H11-Gal4* の自由継続リズムの回復に寄与していることが考えられる。

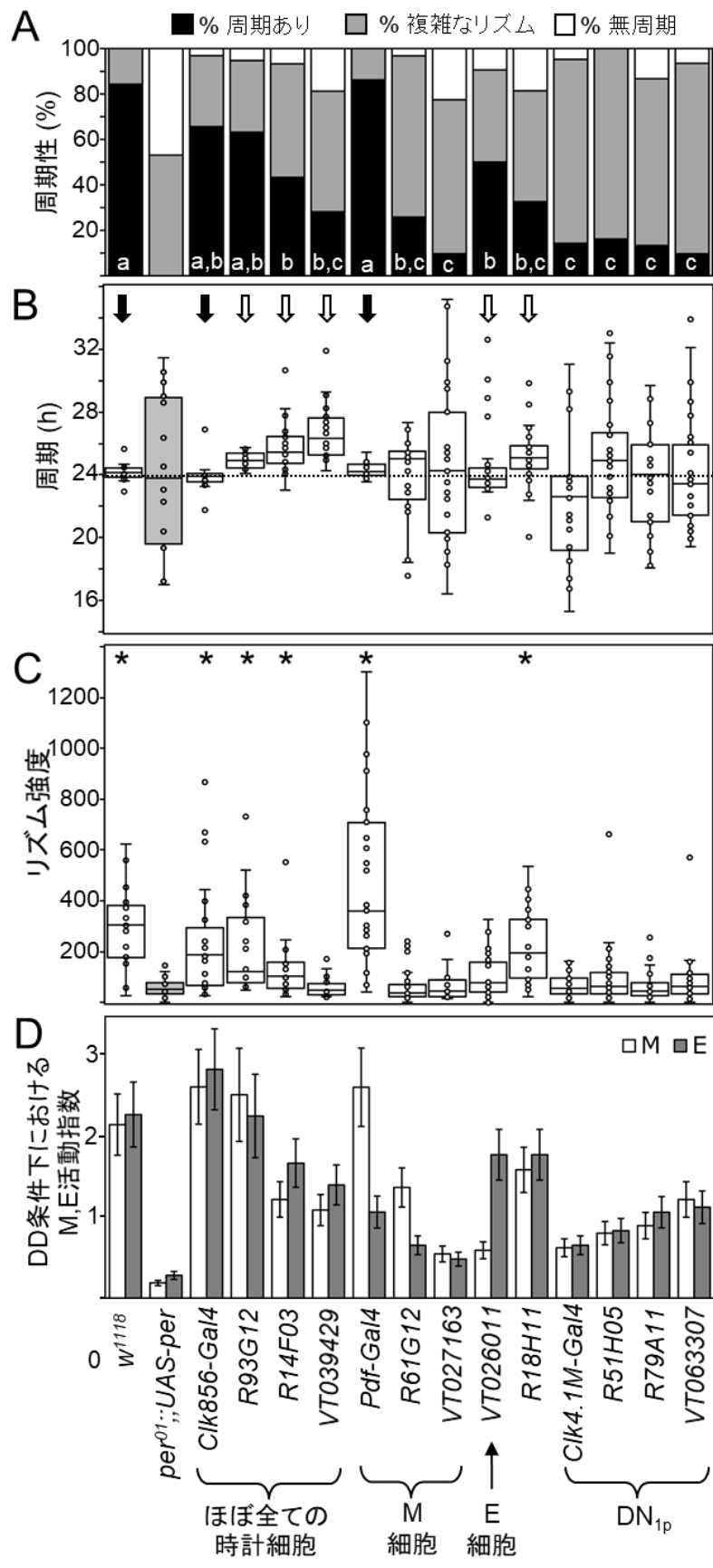
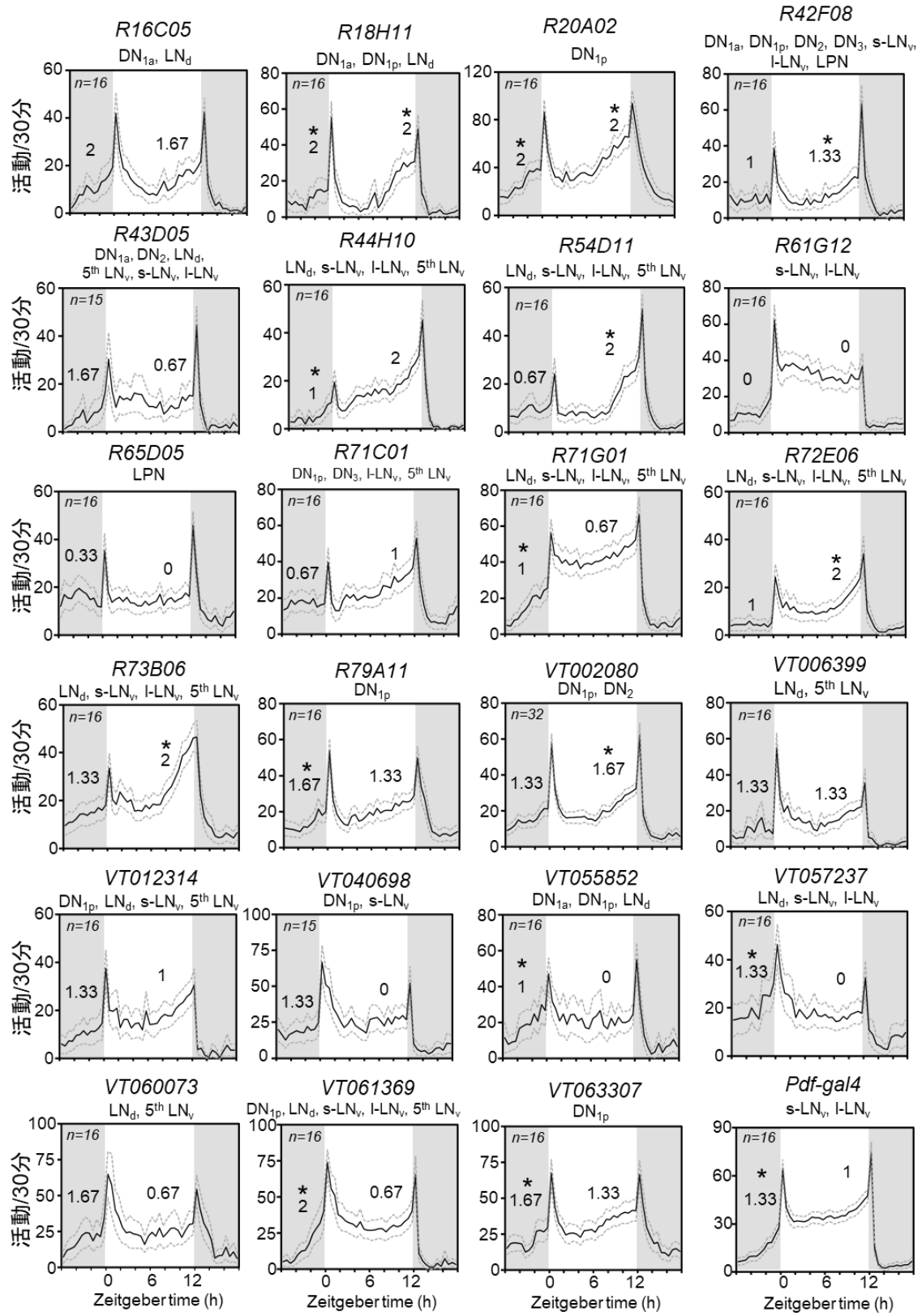


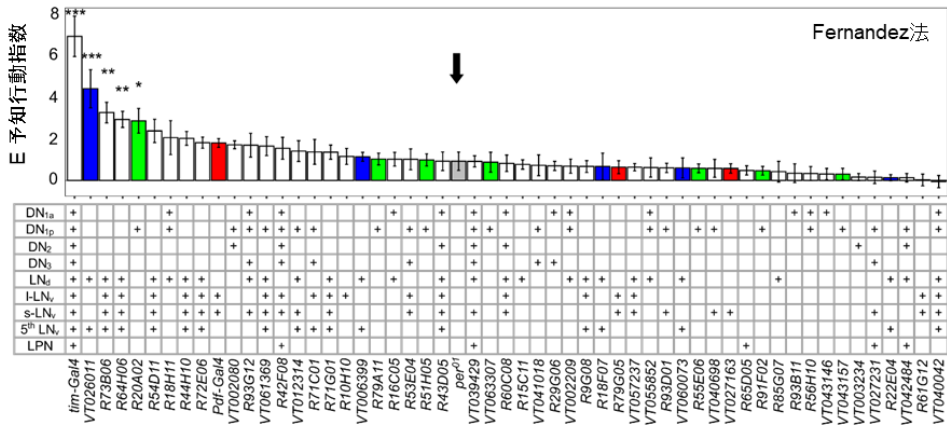
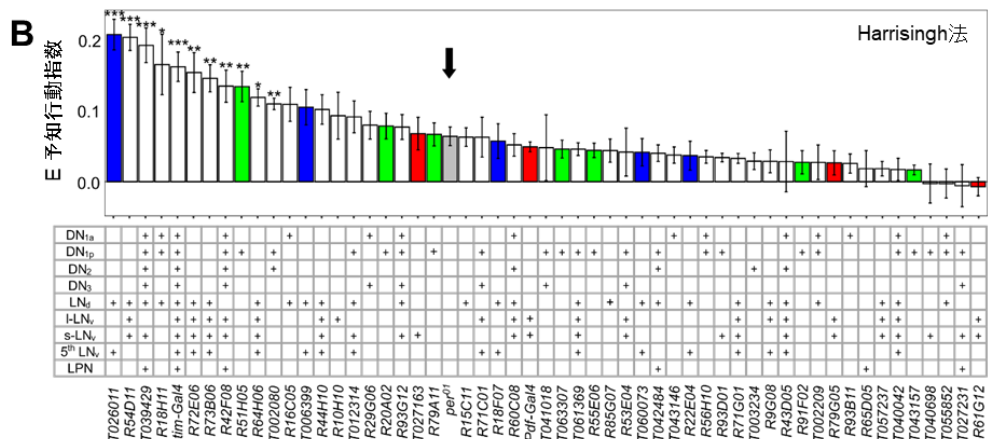
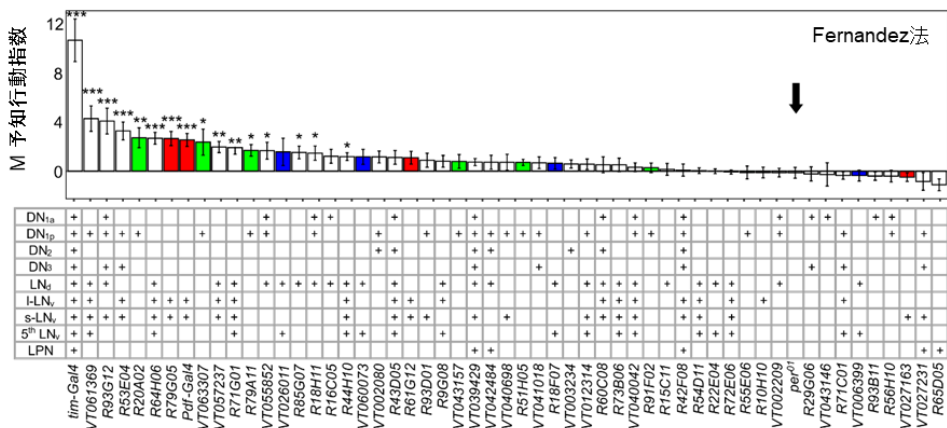
図 10

特定の *per* レスキュー系統の DD 条件下における (A) 周期性、(B) 周期、(C) リズム強度、(D) M と E 活動指数。(A) における異なるアルファベットは、周期あり、複雑なリズム、無周期の割合の違いを示している。(B) における白色の矢印は、バラツキが狭いグループを示し、黒い矢印はバラツキがかなり狭いグループを示している。矢印で示した系統は、*per*⁰¹ と比べて、有意に異なる分散を示した (Levene test $p < 0.05$)。 (C) 星印は、リズム強度が *per*⁰¹ と比べて有意に高い系統を示している ($p < 0.01$)。 (D) M、E 活動指数では、アクトグラムをブラインドテストで評価した。3 の最大値は、M または E ピークがすべての 3 人の研究者によって認められたということを示している。



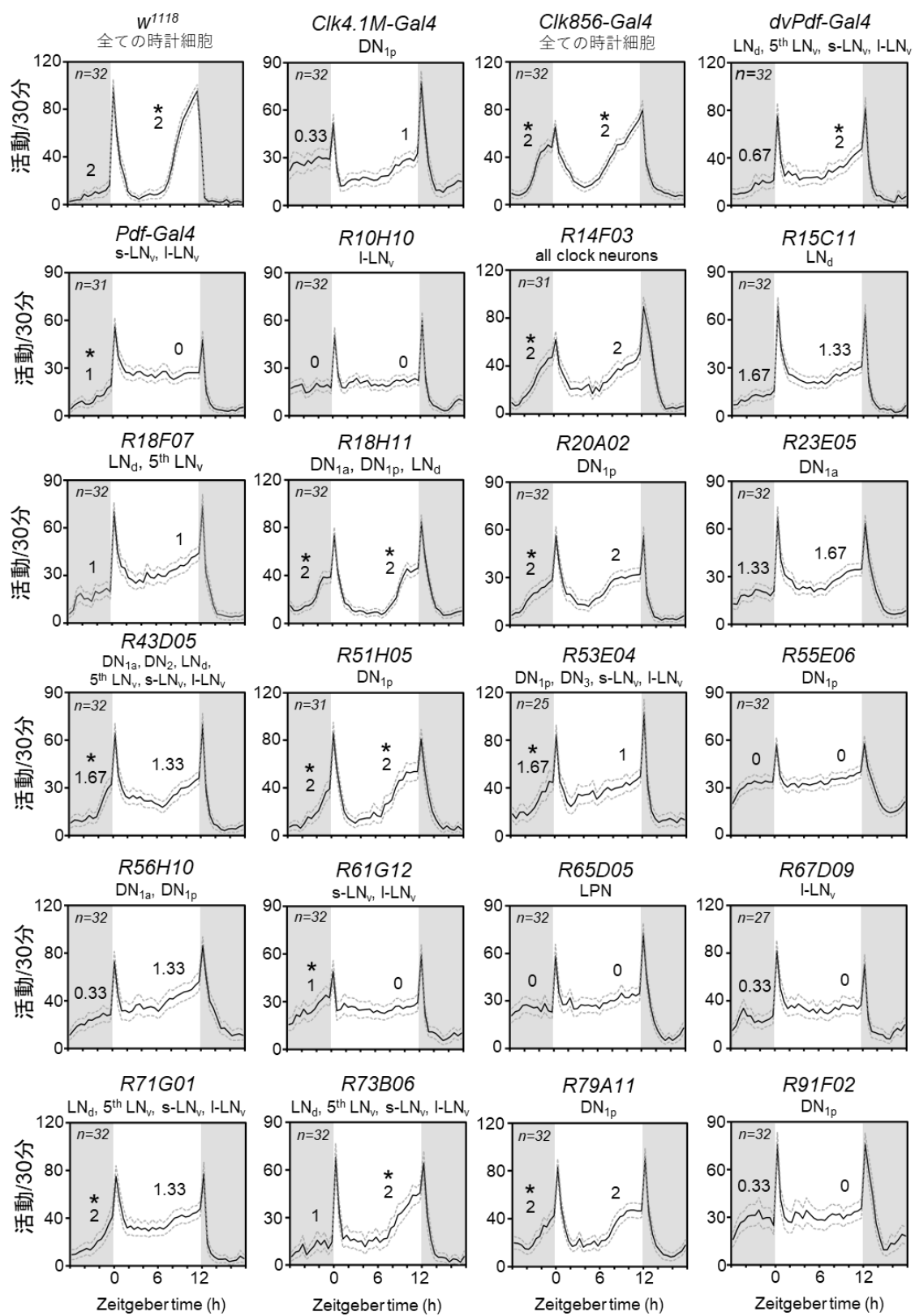
補足図 1

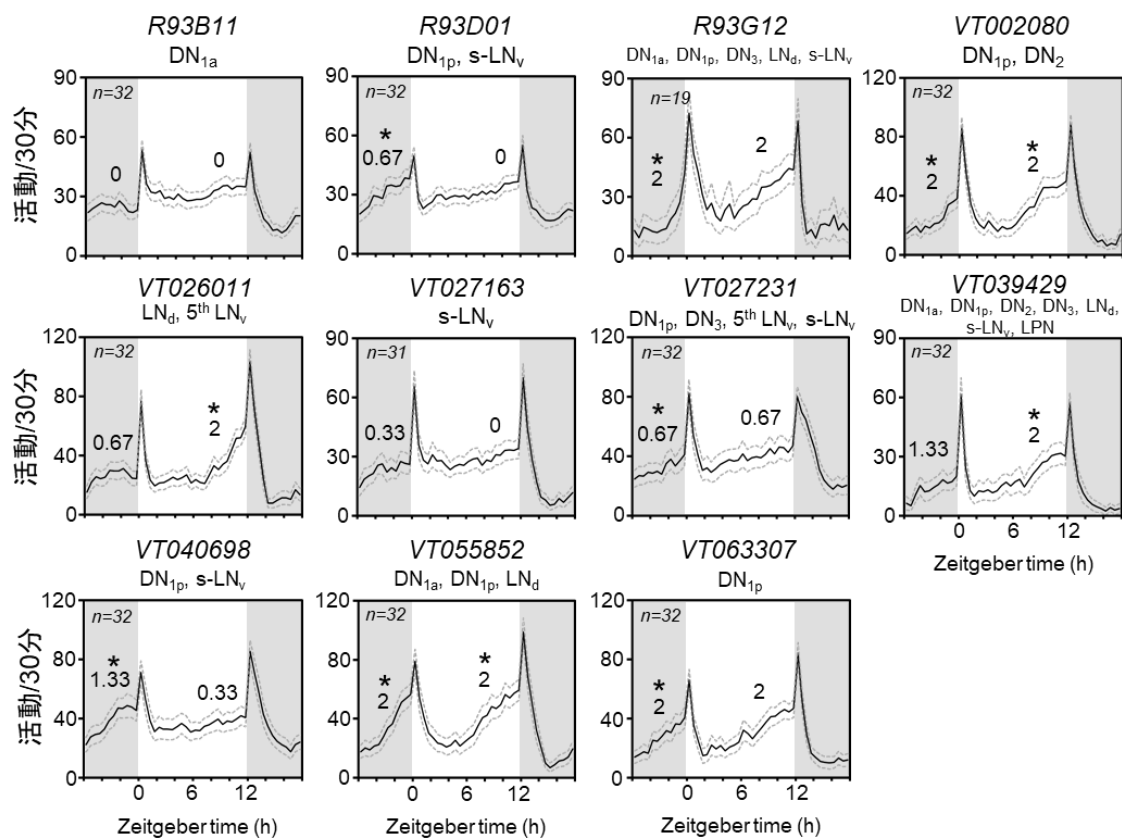
(A) LD、20℃条件下における戻し交配前の *per* レスキュー系統の活動パターン（平均±標準誤差）。系統ごとに活動量が異なることが観察された。グラフ上の数字は、ブラインドテストで評価した各ピークのスコアを示している。活動パターンのラベルは図 1 と同様である。



補足図 2

Harrisingh、Fernandez 指数を用いて、*per* レスキュー系統 (w^{1118} で戻し交配前) の **A** 朝方 (M)、**B** 夕方 (E) の予知行動指数を算出した。ネガティブコントロールは灰色と矢印で示している。M 細胞で *per* をレスキューした系統は赤、E 細胞で *per* をレスキューした系統は青、DN1p で *per* をレスキューした系統は緑で示している。アスタリスクはネガティブコントロールと比較して有意差があることを示す (*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$)。





補足図 3

LD、20℃条件下におけるすべての *per* レスキュー系統（戻し交配後）の活動パターン（平均±標準誤差）。戻し交配前の *per* レスキュー系統（補足図 1）と比べると、系統間でみられた活動量の差はほとんどなくなり、安定的な結果が得られた。活動パターンのラベルは図 1 と同様である。

Strains	Reference
<i>w¹¹¹⁸</i>	[BDSC] #5905
<i>per⁰¹::UAS-per¹⁶</i>	(Blanchardon et al., 2001)
<i>tim01</i>	(Sehgal et al., 1994)
<i>Pdf-Gal4</i>	(Renn et al., 1999)
<i>dvPdf-Gal4</i>	(Bahn et al., 2009)
<i>UAS-GFP S65T</i>	[BDSC] #1522
<i>tim(UAS)-Gal4</i>	[BDSC] #80941; (Blau and Young, 1999)
<i>Clk4.1M-Gal4</i>	[BDSC] #36316; (Zhang et al., 2010)
<i>Clk856-Gal4</i>	[BDSC] #93198; (Gummadova et al., 2009)
<i>R9G08-Gal4</i>	[BDSC] #41335
<i>R10H10-Gal4</i>	[BDSC] #48445
<i>R14F03-Gal4</i>	[BDSC] #48648
<i>R15C11-Gal4</i>	[BDSC] #48684
<i>R16C05-Gal4</i>	[BDSC] #48718
<i>R18F07-Gal4</i>	[BDSC] #47876
<i>R18H11-Gal4</i>	[BDSC] #48832
<i>R20A02-Gal4</i>	[BDSC] #48870
<i>R22E04-Gal4</i>	[BDSC] #49873
<i>R23E05-Gal4</i>	[BDSC] #49029
<i>R29G06-Gal4</i>	[BDSC] #49499
<i>R42F08-Gal4</i>	[BDSC] #50164
<i>R43D05-Gal4</i>	[BDSC] #41259
<i>R44H10-Gal4</i>	[BDSC] #41267
<i>R51H05-Gal4</i>	[BDSC] #41275
<i>R53E04-Gal4</i>	[BDSC] #50433
<i>R54D11-Gal4</i>	[BDSC] #41279
<i>R55E06-Gal4</i>	[BDSC] #39121
<i>R56H10-Gal4</i>	[BDSC] #61644
<i>R60C08-Gal4</i>	[BDSC] #48227
<i>R61G12-Gal4</i>	[BDSC] #41286
<i>R64H06-Gal4</i>	[BDSC] #49608
<i>R65D05-Gal4</i>	[BDSC] #39351
<i>R67D09-Gal4</i>	[BDSC] #49618

<i>R71C01-Gal4</i>	[BDSC] #39570
<i>R71G01-Gal4</i>	[BDSC] #39599
<i>R72E06-Gal4</i>	[BDSC] #39776
<i>R73B06-Gal4</i>	[BDSC] #42024
<i>R79A11-Gal4</i>	[BDSC] #40025
<i>R79G05-Gal4</i>	[BDSC] #40046
<i>R85G07-Gal4</i>	[BDSC] #48383
<i>R91F02-Gal4</i>	[BDSC] #40584
<i>R93B11-Gal4</i>	[BDSC] #40643
<i>R93D01-Gal4</i>	[BDSC] #47221
<i>R93G12-Gal4</i>	[BDSC] #40667
<i>VT002080-Gal4</i>	[VDRC] #201013
<i>VT002209-Gal4</i>	[VDRC] #202243
<i>VT003234-Gal4</i>	[VDRC] #204905
<i>VT006399-Gal4</i>	[VDRC] #201214
<i>VT012314-Gal4</i>	[VDRC] #201941
<i>VT026011-Gal4</i>	[VDRC] #202418
<i>VT027163-Gal4</i>	[VDRC] #203396
<i>VT027231-Gal4</i>	[VDRC] #205530
<i>VT039429-Gal4</i>	[VDRC] #205460
<i>VT040042-Gal4</i>	[VDRC] #200350
<i>VT040698-Gal4</i>	[VDRC] #204746
<i>VT041018-Gal4</i>	[VDRC] #202627
<i>VT042484-Gal4</i>	[VDRC] #200823
<i>VT043146-Gal4</i>	[VDRC] #204626
<i>VT043157-Gal4</i>	[VDRC] #200648
<i>VT055852-Gal4</i>	[VDRC] #200573
<i>VT057237-Gal4</i>	[VDRC] #203881
<i>VT060073-Gal4</i>	[VDRC] #200542
<i>VT061369-Gal4</i>	[VDRC] #200578
<i>VT063307-Gal4</i>	[VDRC] #203815

補足表 1：本実験で使用したショウジョウバエの系統

1.5. 考察

2 振動体モデルでは、概日時計がどのようにして季節に応じた行動の変化を引き起こすかを説明している (Daan & Pittendrigh, 1976; Yoshii et al., 2023)。このモデルを検証するために、ショウジョウバエ研究者たちは様々な遺伝学的手法を利用して、2つの振動体に相当する時計細胞の探索を行ってきた。GAL4/UAS システムは、組織特異的な遺伝子発現を誘導することができる有用な遺伝学的手法である。特に、ショウジョウバエ概日時計の研究では、特定の時計細胞の破壊 (Blanchardon et al., 2001; Renn et al., 1999; Stoleru et al., 2004)、神経活動の不活性化 (Bulthuis et al., 2019; Depetris-Chauvin et al., 2011; Nitabach et al., 2002; Wu et al., 2008)、神経活動の活性化 (Nitabach et al., 2006)、そして時計タンパク質の振動速度を調節するキナーゼの発現誘導 (Stoleru et al., 2005; Yao & Shafer, 2014; Yao et al., 2016; Zhang et al., 2010a) などに使用されてきた。しかし、これらの操作では発生段階から遺伝的な変化を加えるため、時計神経ネットワークで行われている情報伝達にも影響を及ぼしている可能性が否定できない。そこで、比較的安全な方法として以下の2つの方法が提案されている。まず、1) 特定の時計細胞でのみ時計遺伝子の機能喪失型変異を誘導し、特定の時計細胞でのみ時計機能を停止させる方法 (Delventhal et al., 2019; Schlichting et al., 2019)。次に、2) *per⁰¹* のような時計突然変異体を利用し、特定の時計細胞でのみ遺伝子のレスキューを行う方法である。後者の方法では、全ての Lateral neuron や s-LNv のみ (Cusumano et al., 2009; Grima et al., 2004)、一部の CRY 陽性時計細胞 (Cusumano et al., 2009)、一部の LNd (Cusumano et al., 2009; Rieger et al., 2009)、そしてほとんどの DN1p (Menegazzi et al., 2020; Zhang et al., 2010b) で *per* レスキューが有効であることがわかっている。

本研究では、これまでで最も多くの Gal4 システムを使用し、M、E ピークの形成に関わる時計細胞を網羅的に調べた。使用した Janelia、VT Gal4 システムは、エンハンサーに *gal4* 遺伝子を接続したコンストラクトがゲノム上の同じ場所に挿入されていることから、ポジショ

ナルエフェクトの影響を排除できる(Jenett et al., 2012; Tirian & Dickson, 2017)。それにもかかわらず、*per* レスキュー系統における、LD 条件下での M、E ピークの回復具合は系統ごとに異なっていた。これは、それぞれの系統がもつエンハンサー活性によるものである可能性が考えられる。また、本実験で行われた *per* レスキューでは、*per* 発現リズムを転写レベルで回復したわけではない。従って、翻訳後のメカニズムに依存した時計機能のレスキューである(Cheng & Hardin, 1998)。この方法では、PER レベルが最適な範囲にある場合にのみ効率的に機能し、最適な範囲を超えた場合は PER の振動が損なわれる。例えば、PER 過剰発現が時計機能の停止を引き起こしたことが報告されている(Blanchardon et al., 2001)。従って、すべての時計細胞で *per* レスキューを行なった系統でも時計機能が回復しない可能性は十分考えられる。しかし、*VT026011-Gal4*、*R18F07-Gal4* 系統のように同じ PER 発現レベル・パターンを持つ系統間でも結果が異なったことの説明にはならない(図 4)。これらの系統では、*tim* レスキュー実験でも類似した結果が得られたことから(図 4A, 5)、GAL4 タンパク質の毒性(Kramer & Staveley, 2003)や、時計細胞以外における GAL4 発現の影響が原因だと考えられる。従って、*VT026011-Gal4*、*R18F07-Gal4* 系統でみられた違いは *per* レスキュー実験に特有のものではなく、未知の遺伝的差異である可能性を示唆している。また、*R71G01-Gal4* (LN_d、5th LN_v、s-LN_v、l-LN_v)系統を用いた *per* レスキューでは、明確な M ピークの回復がみられたが、E ピークは回復しなかった。一方で、*tim* レスキューでは両方のピークを回復した(図 6)。以上のことから、レスキューする時計遺伝子依存的な効果がみられた。これは、PER、TIM レベルにはそれぞれ異なる最適値がある可能性が考えられる。

本研究で得られた結果から、*per* レスキュー実験の結果の解釈は慎重に行う必要があることが示された。たとえ、レスキュー系統で活動ピークや自由継続リズムが回復しない場合においても、その時計細胞の関与を否定することはできない。決定的な結果を得るためには、異なる Gal4 系統を用いた実験を実施する必要がある。従って、本研究で行われた

多数の Gal4 系統を利用した網羅的スクリーニング結果は、今後実験に最適な Gal4 系統選
びにも利用できるだろう。

1.5.1 M・E ピークの最適な評価方法

本研究では、M・E ピークを評価するために、3つの異なる方法を用いた。Harrisingh 指数と Fernandez 指数は、光の点灯・消灯を事前に予知して動く、予知行動を定量する客観的な評価方法である。予知行動は、単なる環境変化への反応ではなく、概日時計によるものである。約 24 時間のリズムの概日時計をもつ野生型では、光の点灯・消灯を事前に予知して動くことが観察されている(Helfrich-Förster, 2000)。しかし、長周期の系統のような、約 24 時間のリズムを超えたショウジョウバエでは、24 時間のリズムで変わる光の点灯・消灯後に活動を開始する傾向がある。しかし、時計機能が部分的にしか回復しない *per* レスキュー系統の自由継続リズムが約 24 時間の枠に収まるかわからない。そこで、評価する遺伝子型を知らない 3 人の経験豊富な研究者によるブラインドテストから M、E ピークの評価が行われた。その結果、3つの方法にはそれぞれ強みと弱みがあることがわかった。Harrisingh 指数はシンプルかつ客観的であり、E ピークを検出に適していたが、M ピークの検出は困難であった。同様に、ブラインドテストであっても、ネガティブコントロールの示す M 活動と実際の M 活動を明確に区別することは困難であった。M ピークの検出の難しさには 2 つの理由がある。まず、ショウジョウバエの M の予知行動は温度に強く依存しており、環境温度が低いほど弱くなる(Majercak et al., 1999; Vanin et al., 2012)。本研究では、ショウジョウバエの活動を 20°C で記録した。これはショウジョウバエの最適な温度よりもわずかに低い温度である(Kaneko et al., 2012)。そのため、本研究で得られたデータでは、予知行動が低くなることが考えられる。これはポジティブコントロールとして使用した *w¹¹¹⁸* でも観察される(図 3)。次に、*per⁰¹* ネガティブコントロールは、光が点灯する前の夜半以降にすでに活動を示していることである。そのため、Harrisingh 指数、

ブラインドテストの両方で、*per*⁰¹の活動と M 細胞で *per* レスキュー系統の予知行動を区別することは困難である（図 3, 8）。*per*⁰¹の示す M ピークに関しては既に先行研究で報告されており、*per* を失っていても M 振動体がある程度機能していることが指摘されている (Helfrich & Engelmann, 1987; Helfrich-Förster et al., 2001; Menegazzi et al., 2020)。一方で、Fernandez 指数では *per*⁰¹ と M 細胞で *per* レスキュー系統の M ピークの区別・評価を問題なくできた（図 3）。これは、光が点灯前の 3 時間以内における活動を定量する方法であり、*per*⁰¹の示すそれ以前の活動は解析に影響を与えない。従って、Fernandez 指数は他の 2 つの方法より M ピークの評価に適している。一方で、E ピークの評価にはどの方法も基本的には有効なことがわかった。しかし、Fernandez 指数が消灯の 3 時間以上前に発生する早期の活動増加を検出しないため（図 1 の R51H05 を参照）、Harrisingh 指数やブラインドテストの方が適しているとも言える。ただし、Harrisingh 指数は、消灯前の最後の 3 時間に活動ピークを示す場合（図 7 の R79A11 を参照）や、早期のシエスタが発生し、その直後に E 活動が増加する場合（図 7 の VT063307 を参照）は有効ではない。これらのことから、M、E 活動を判断する方法は慎重に選択する必要があり、視覚的なチェックが常に重要であることを示している。同じ 3 つの LNd、5th LNV をターゲットにした VT026011-Gal4、R18F07-Gal4 を用いた *per* レスキュー系統の違いは、シエスタの深さに明らかな違いがみられた（図 4A）。いずれの評価方法を用いた場合でも、R18F07-Gal4 を用いた *per* レスキュー系統において E 予知行動を検出できなかったが、これは現状のデータ解析における限界である。予知行動をより細かく検出することは依然として困難な課題であり、今後よりよい解析手法の開発が必要である。

1.5.2 M・E 活動は独立した M・E 振動体による複雑なネットワークで制御されているのか？

これまでの研究から、M、E 振動体が M、E 活動ピークを制御するとされているが、その他の時計細胞がこの制御に果たす役割はあまりよく分かっていなかった。ここでは、s-LNv が M 振動体として、5th LNv、3 LNd が E 振動体としての機能をもつことを確認した。これらの時計細胞で *per* を発現させると、M、E ピークの回復が多くの系統でみられた。そして、これは DD 条件下でも同様である（図 10D）。それにもかかわらず、s-LNv での *per* レスキューでは、DD 条件下で E ピークがみられた（図 8）。これは、s-LNv が *per* を持たない E 細胞とコミュニケーションをとることによって引き起こされる可能性や E ピークにみえる活動は E 振動体とは無関係な行動である可能性も考えられる。先行研究では、s-LNv が PDF を介して異なる E 細胞とコミュニケーションをとり、E 細胞の分子リズムを遅らせることはできるが、早めることはできないことが報告されている(Yao et al., 2016)。しかし、時計機能が失われている場合にどのように機能するのかは不明である。本研究では、これらの可能性を区別することはできなかった。

さらに注目すべきは、LD、DD 条件下でも、一部の DN1p のみ *per* レスキューを行なったショウジョウバエで M、E ピークが見られたことである（図 9, 10）。DN1p の神経活動は、早朝にピークを迎え、午後にトラフを迎えることが示されている(Flourakis et al., 2015; Liang et al., 2016)。これは DN1p が M 振動体としての役割を担っていることと一致する。さらに、先行研究では、DN1p が高温条件下で朝の覚醒を促進することが示されている(Lamaze et al., 2017)。しかし、DN1p は M、E 振動体で構成されている (Chatterjee et al., 2018; Zhang et al., 2010a)。従って、他の時計細胞に *per* がなくても M、E 活動ピークを形成できるが、わずか 4 つの CRY 陽性 DN1p だけでこれが可能であることは新たな発見である。これまで、CRY 陽性 DN1p は M 振動体と考えられていたが(Chatterjee et al., 2018)、新たに CRY 陽性 DN1p 内で M、E 振動体が混在していることを明らかにした。

まとめると、本研究により M、E 予知行動を制御し、LD、DD 条件下で二峰性の活動パターンを維持するために相互に補償できる、複数の時計細胞群による独立した M、E 振動体の存在を支持する結果が得られた。

1.5.3 概日リズムは、時計細胞の階層的なネットワークによって制御されているのか？

複数の先行研究より、神経ペプチド PDF を発現する s-LNv は、LD 条件下における M 活動を形成するだけでなく、DD 条件下でも自由継続リズムの形成に必須であることが示唆されている (Cusumano et al., 2009; Grima et al., 2004; Helfrich-Förster, 1998; Nitabach et al., 2002; Renn et al., 1999; Rieger et al., 2009; Stoleru et al., 2004)。そのため、s-LNv は、他の時計細胞の上流に位置する主要なペースメーカーと考えられている (Guo et al., 2014; Top & Young, 2018)。しかし、特定の時計細胞特異的な CRISPR-Cas9 を用いた先行研究では、s-LNv、l-LNv における *per*、*tim* をノックアウトしても、DD 条件下の自由継続リズムが完全に失われないことを示している。これは、他の時計細胞の時計機能が失われたものを補完できることを示唆している (Delventhal et al., 2019; Schlichting et al., 2019)。このことから、s-LNv は他の時計細胞の上流ではなく、複数の時計細胞群に役割が分散されており、複雑なネットワークで相互に作用していることを示唆している。このモデルは、特定の時計細胞群における神経活動や振動速度を遺伝的に操作したいいくつかの研究によって支持されている (Bulthuis et al., 2019; Stoleru et al., 2005; Yao & Shafer, 2014; Yao et al., 2016; Zhang et al., 2010a)。

本研究では、数個の DN1p に対する *per* レスキューが一時的にはあるものの、複雑な自由継続リズムを示し、M、E 活動の形成を行うことができることを初めて示した (図 9)。この結果は、概日時計の制御が複数の時計細胞群に分散されており、これらが相互に補償できるという仮説を支持している。また、先行研究では、DN 時計細胞群が自律振動可能な時計細胞であることが示されている (Veleri et al., 2003)。しかし、DD 条件下で概

日リズムを制御する重要性は限定的である。すべての DN1p の神経活動を抑制しても、自由継続リズムの強度は低下するものの、自由継続リズムには影響がなかった(Nettnin et al., 2021)。DN1p は、s-LNv から時計情報を受け取ることから、s-LNv の下流細胞であることが想定されていたが、行動リズムには必須でないことが考えられる(Lamaze & Stanewsky, 2019; Nettnin et al., 2021; Reinhard et al., 2022b)

本研究では、少数の DN1p が複雑なリズム性を制御できることを示した。*per*⁰¹ の約半数も複雑なリズムを示したが、少数の DN1p で *per* がレスキューされた個体のリズムは、*per*⁰¹ のリズムとは明らかに異なっていた(図 9)。*per*⁰¹ の自由継続リズムが 16 時間から 36 時間の間であったことに対して、DN1p で *per* がレスキューされた個体の自由継続リズムは約 24 時間周期の範囲内であり、リズムの強度も高かった(図 9, 10)。

本研究の結果から、時計機能を回復させる時計細胞群ごとに DD 条件下における自由継続リズムの回復具合が異なることがわかった。最も自由継続リズムの回復率がよかったのは、LNv のみに *per* を発現させた系統。次に、LNv を含む複数の時計細胞 (*Clk856-Gal4*、*R93G12-Gal4*)、または DN1p、DN1a、1 つの LNd (*R18H11-Gal4*)で *per* を発現させた場合である。最後に、E 細胞 (5th LNv、3 LNd)での *per* レスキューであった。これらのことから、LNv が最も高い能力を持ち、次に DN (おそらく LNv と連結している DN1a (Fujiwara et al., 2018; Kuwano et al., 2023))、E 細胞 (5th LNv、3 LNd)が続く。従って、ある種の階層が存在するものの、すべての時計細胞が概日リズムの回復を行えることが示された。

第 2 章：Trissin/TrissinR シグナル伝達の機能解析

2.1. 要旨

ショウジョウバエ概日時計は、時計細胞で発現する神経伝達物質を介した複雑な神経ネットワークによって制御されている。これらの神経伝達物質の機能は徐々に明らかになりつつあるが、Trissin などの一部の神経ペプチドの役割は未だ解明されていない。Trissin は、時計細胞である dorsolateral neuron (LN_d)で発現し、その受容体である TrissinR は dorsal neuron 1 (DN1)と LN_d で発現する。本研究では、ショウジョウバエ概日ネットワーク内での Trissin/TrissinR シグナル伝達経路の役割を探索した。新規に作製した抗 Trissin 前駆体抗体を利用し、その発現には概日リズムがあることを明らかにした。さらに、行動解析では、*Trissin* または *TrissinR* をノックアウト、またはノックダウンした場合、恒暗条件下の夕方の活動オフセットの遅延が認められた。また、*Trissin* ノックダウンを行ったショウジョウバエで見られた夕方の活動オフセットの遅延は、*Ion transport peptide (ITP)* の追加ノックダウンによって回復した。これは、Trissin/TrissinR シグナル伝達経路が ITP を介して情報を伝達していることを示す結果である。従って、Trissin/TrissinR 経路は、ITP と協調して、夕方の活動オフセットのタイミングを調整する重要な調節因子である可能性が示唆された。

2.2. 序論

概日時計は、様々な周期現象を制御する保存性の高い生理機構である。動物では、脳内にある時計細胞と呼ばれる神経細胞によって遺伝子発現レベルで約 24 時間の概日リズムが生まれる。時計細胞で生まれた遺伝子発現リズムは、時計細胞間で情報伝達に用いる神経伝達物質の時間依存的な情報伝達を可能にし、強固な概日リズムを生み出すことができる(Yoshii & Fukuda, 2023)。しかし、時計神経ネットワークの根底にある詳細なメカニズムは完全には解明されていない。

キイロショウジョウバエは概日時計や神経ネットワーク研究のモデル生物として頻繁に利用されてきた。ショウジョウバエの脳内には約 150 個の時計細胞が存在し、それぞれ異なる機能、形態、神経伝達物質をもっている。これらの時計細胞は形態学的な位置により以下の 9 グループに分類されている。small ventrolateral neurons (s-LNv)、large ventrolateral neurons (l-LNv)、5th ventrolateral neuron (5th LNv、5th LN、5th s-LNv としても知られる) (Schubert et al., 2018)、dorsolateral neurons (LNd)、lateral posterior neurons (LPN)、anterior dorsal neurons 1 (DN1a)、posterior dorsal neurons 1 (DN1p)、dorsal neurons 2 (DN2)、dorsal neurons 3 (DN3) (Helfrich-Förster et al., 2007)。

ショウジョウバエで観察される最も顕著な周期現象は、朝方 (M) と夕方 (E) の活動からなる 1 日の活動パターンである。これまでの研究で、M 活動は主に s-LNv (M 細胞) によって制御されているのに対し、E 活動は 5th LN と LNd (E 細胞) によって制御されていることが明らかになっている(Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004)。さらに、特に DN1p は、他の時計細胞からの時計情報を統合し、M または E 活動を制御していることが知られている(Chatterjee et al., 2018; Nettnin et al., 2021; Zhang et al., 2010a)。

E 細胞として分類されている LNd は、その機能やペプチド発現をもとに、3 つの異なるグループ (E1、E2、E3) に細分化されている。具体的には、E1 ニューロンは神経ペプチド Trissin と sNPF (small neuropeptide F) を発現する 2 つの LNd からなる。E2 ニューロン

は、Neuropeptide F (NPF)を発現する 5th LN_v、ion transport peptide (ITP)を発現する LN_d からなる。さらに、E3 ニューロンには 3 つの LN_d があり、そのうち 2 つは NPF を発現している(Ma et al., 2021)。従って、E 活動の調節は、異なる性質をもつ神経細胞が制御する複雑なプロセスであることが示唆されている。

ITP と NPF は、E 活動を促進する神経ペプチドとして分類されている(Hermann et al., 2012; Hermann-Luibl et al., 2014)。近年の研究により、Trissin 陽性 LN_d (E1 ニューロン) は、夕暮れ時の E 活動オフセットの促進に関与していることが明らかになった(Brown et al., 2024)。しかし、E 活動オフセットに関与する神経伝達物質は未解明である。さらに、Trissin/TrissinR シグナル伝達経路の E 活動制御における役割は全くわかっていない。

そこで本研究では、時計ネットワークにおける神経ペプチド Trissin とその受容体である TrissinR の役割を調べた。

2.3 材料と方法

2.3.1 実験動物

本研究では、*white*¹¹¹⁸ (*w*¹¹¹⁸; Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) #5905)を *period*⁰¹ (*per*⁰¹)系統 (Konopka & Benzer, 1971)、*Trissin* ノックアウト (*Trissin*^{attp})系統、*TrissinR* ノックアウト (*TrissinR*^{attp})系統 (Deng et al., 2019)のコントロールとした。*Trissin* と *TrissinR* の細胞特異的な機能を調べるために、Gal4/UAS システムを利用して、時計細胞特異的な遺伝子ノックダウンを実施した。ノックダウン実験では、*UAS-gfp*^{RNAi} (VDRC #60102TK、#60103 TK) 系統をコントロールとし、*UAS-Trissin*^{RNAi} (VDRC #105016)、*UAS-TrissinR*^{RNAi} (VDRC #107943)、*UAS-itp*^{RNAi} (VDRC #43848) 系統を目的遺伝子のノックダウンに使用した。ノックダウン効率を高めるために、*UAS-dicer2* を *UAS-RNAi* 系統と共発現させている (Dietzl et al., 2007)。*UAS-dicer2*; *X-Gal4* の雌を *UAS-RNAi* 系統の雄と交配させることで、組織特異的なノックダウンが可能となる。本実験で使用した Gal4 系統は、*Clk4.1M-Gal4* (Zhang et al., 2010b)、*Clk856-Gal4* (Gummadova et al., 2009)、*Trissin-Gal4* (Deng et al., 2019), and *R73B06-Gal4* (Pfeiffer et al., 2008; Sekiguchi et al., 2020)である。*Trissin* の発現リズム解析では、時計細胞を可視化する目的として、*Clk856-Gal4* と *UAS-Redstinger* (BDSC #8546)を利用し、時計細胞の核を標識した。また、系統間の遺伝的バックグラウンドによる影響を排除するために、*per*⁰¹, *UAS-dicer2*, *UAS-Redstinger* 以外の系統では、*w*¹¹¹⁸ を用いて最低 6 回の戻し交配を行った。実験で使ったすべてのショウジョウバエは、明暗 12 時間 : 12 時間 (LD12:12)、25℃の環境でショウジョウバエ飼育飼料 (寒天 0.7%、8.0%グルコース、3.3%イースト、4.0%コーンミール、2.5%小麦胚芽、0.25% プロピオン酸) で飼育した。

2.3.2 活動リズムの測定とデータ解析

ショウジョウバエの活動を記録するために、生後 1-6 日以内の雄成虫を用いた。ショウジョウバエは、餌（2%アガロースと 4%スクロース）が充填された活動記録用チューブに移した。その後、Drosophila Activity Monitor (DAM2; TriKinetics Inc., Waltham, MA, USA) に挿入し、活動を記録した。活動記録の実験は、CN-40A インキュベーター (Mitsubishi Electric, Tokyo, Japan)を用いて温度を 20°Cに管理した。活動記録装置の上部には白色 LED を設置し、LC4 light controller (TriKinetics Inc.)で光制御を行った。光の強度は、100 lux ($3.2 \mu\text{W}^{-2}$)で実験を行った。ショウジョウバエは、12 時間：12 時間 明暗サイクルで 7 日活動を記録した後に、恒暗条件 (DD)で 1-14 日記録した。

2.3.3 抗体および免疫化学的手法

ショウジョウバエを 4%パラホルムアルデヒドおよび 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)を用いて 2.5 時間、25°Cで固定した。その後、固定したハエを PBS で 3 回洗浄し、解剖により脳を取り出し、PBS に 0.5% Triton X-100 (PBS-T)を含む溶液で 3 回洗浄した。次に、PBS-T（5%正常ロバ血清を含む）溶液を用いて 1 時間、25°Cでブロッキングし、1 次抗体で 72 時間、4°Cでインキュベートした。インキュベーション後、脳を PBS-T で 6 回洗浄し、2 次抗体を用いて 3 時間、25°Cインキュベートした。最後に、PBS-T で 6 回洗浄し、Vectashield mounting medium で封入した (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)。ウサギ由来 抗 Pre Trissin 抗体は、ショウジョウバエの Trissin 前駆体の C 末端フラグメント、 $\text{NH}_2\text{-C} + \text{RKRS DPDALRQSSN-COOH}$ に対して作製された (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)。以下の蛍光標識 2 次抗体を 1:500 の希釈率で使用した：Alexa Fluor® 488 nm (ヤギ由来 抗ニワトリ抗体)。染色は Olympus FV3000 レーザー走査共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて撮影した。Trissin 発現リズムを蛍光から定量する際には、すべての実験で同じ共焦点顕微鏡の設定で行っ

た。染色強度は先行研究の方法と同じく Fiji ソフトウェアを使用して測定した (Fujiwara et al., 2018; Schindelin et al., 2012)。

2.4 結果

2.4.1 ショウジョウバエの脳内における Trissin 発現

LNd における Trissin の局在を明らかにするために、Trissin 前駆体ペプチドを標識できる抗体を作製し、*Clk856 > Redstinger* 系統（ほぼ全ての時計細胞の核を標識できる）の脳に対して免疫染色を行った。その結果、Trissin 前駆体の発現は、二つの Redstinger 発現 LNd と共局在していることが確認できた（図 1A, B）。次に、*Trissin > Redstinger* 系統の脳を用いた免疫染色結果より、この抗体が *Trissin-Gal4* 陽性ニューロンを標識し、Trissin 前駆体に特異的な抗体であることを示した（補足図 1）。以上の結果は、Trissin が二つの LNd において前駆体タンパク質として発現し、細胞内で切断を経て活性型の Trissin が形成されることを示している。さらに、得られた Trissin 前駆体の免疫染色の結果は、先行研究で示されている網羅的遺伝子解析の結果と一致していることが確認できた (Abruzzi et al., 2017; Ma et al., 2021)。

2.4.2 LNd における Trissin 発現リズム

時計細胞で発現するいくつかの神経ペプチドは、その発現に概日リズムが確認されている (Díaz et al., 2019; Fujiwara et al., 2018; Hermann-Luibl et al., 2014; Park et al., 2000)。従って、LNd における Trissin 前駆体の発現レベルが概日時計によって調節されているかを検証した。その結果、他の概日時計関連神経ペプチドと同様に、LNd における Trissin 前駆体発現には概日リズムがあることがわかった。図 1C、D は、LD 条件下で異なる Zeitgeber time (ZT) における Trissin 前駆体の発現パターンを示している。LD 条件下における Trissin 前駆体の発現は、ZT2（光が点灯してから 2 時間後）でピークに達し、ZT18（光が消灯してから 6 時間後）でトラフに達した。このリズムは DD 条件下においても持続することが明らかになった（図 1C, D）。概日時計が Trissin 前駆体の周期的な発現に関与しているかを検証するために、抗 Trissin 前駆体抗体を用いて、コントロール系統と

時計を失った *per*⁰¹ 突然変異体の脳を LD 条件下の ZT2、ZT18 で染色した。その結果、コントロール系統では、ZT2 で Trissin 前駆体の発現量が有意に高く、ZT18 で低いことが観察された。一方で、*per*⁰¹ 突然変異体では、ZT2 と Z18 の間で Trissin 前駆体の発現量に有意な差は見られなかった（図 1E）。以上の結果より、LNd における Trissin 前駆体の発現は、概日時計に制御されていることが示唆された。

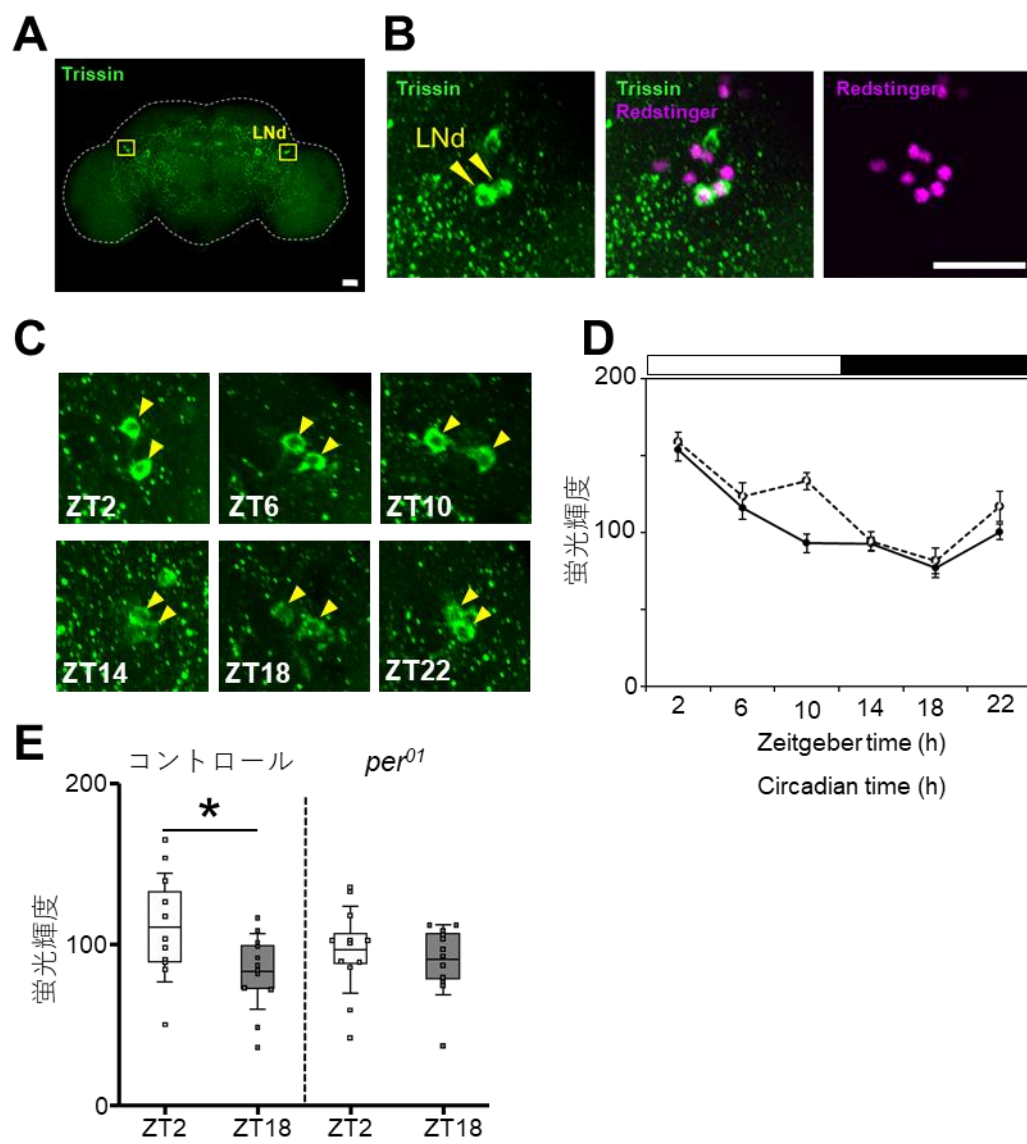


図1 成虫オスショウジョウバエの脳における Trissin 発現パターン

(A, B) *Clk856-Gal4>Redstinger* の脳を抗 Trissin 前駆体抗体で染色し、Trissin 前駆体（緑）と LNd（マゼンタ）を標識した。（B）は拡大図。黄色のボックスと矢印は Trissin-LNd を示し、白い棒はスケールバー（25 μm ）を示している。（C）LD 条件下における 4 時間ごとの Trissin 前駆体染色画像。（D）LD（点線）および DD（実線）条件下における LNd での Trissin 前駆体の染色輝度（平均 $\pm$ 標準誤差）。少なくとも 9 個体の脳の半球が、各タイムポイントで解析された。実験は LD 条件下で 1 回、DD 条件下で 2 回行われた。

CircWave 分析（バージョン 1.4、Dr. R. Hut、<http://Cwww.euclock.org>）によれば、LD ($p < 0.01$, $n = 9$) および DD ($p < 0.05$, $n = 18$) 条件下で、Trissin 前駆体は 24 時間のリズムで発現していた。同様に、1 元配置分散分析（ANOVA）では、LD [$F(5) = 13.48$, $p < 0.01$]、DD [$F(5) = 17.32$, $p < 0.01$] 条件下で時間依存的な蛍光輝度の変化が確認できた。

(E) w^{1118} と per^{01} の脳における Trissin-LNd で Trissin 前駆体発現量の定量。コントロールでは、ZT2 および ZT18 で Trissin 前駆体の発現レベルに有意な差がみられた[Kolmogorov-Smirnov 検定後、t 検定、 $t(21) = 2.276$, $*p < 0.05$, $n = 11$]。一方、 per^{01} では、ZT2 および ZT18 で Trissin 前駆体の発現に有意な差がみられなかった [Kolmogorov-Smirnov 検定後、t 検定、 $t(22) = 0.616$, $p > 0.05$, $n = 12$]。

2.4.3 E 活動オフセットの調節における Trissin/TrissinR シグナル伝達経路の役割

LNd は夕方 (E)活動の調節に関わることがよく知られていることから、Trissin または TrissinR シグナルが E 活動を制御する出力経路であると仮説を立てた (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004)。そこで、Trissin、TrissinR のノックアウト系統である、*Trissin^{-attp}*、*TrissinR^{-attp}* 系統 (Deng et al., 2019)の行動リズムを LD 条件、DD 条件で調べた。LD 条件下では、コントロール系統と比べて、突然変異体の総活動量は低かったものの (補足図 2A)、その活動パターンはほぼコントロール系統と同様であった (補足図 2B-D)。また、Trissin、TrissinR が自由継続リズムの調節に関与しているかを確認するために、*Trissin^{-attp}*、*TrissinR^{-attp}* 系統を DD 条件で 11 日間活動を記録・解析した結果、それぞれの突然変異体において 80%以上の個体が約 24 時間の行動リズムを維持していることが観察された (補足図 2E; 補足表 1)。

LD 条件下のショウジョウバエの行動パターンは光の影響を反映している。例えば、光が消灯すると E 活動が抑制される現象は一般的にマスキング効果として知られている (Rieger et al., 2003)。このマスキング効果を除外するために、DD1 日目の活動を分析した。その結果、DD1 日目において、*Trissin^{-attp}*、*TrissinR^{-attp}* 系統の E 活動オフセットは、コントロール系統と比較して有意に遅延していた (図 2A-D)。

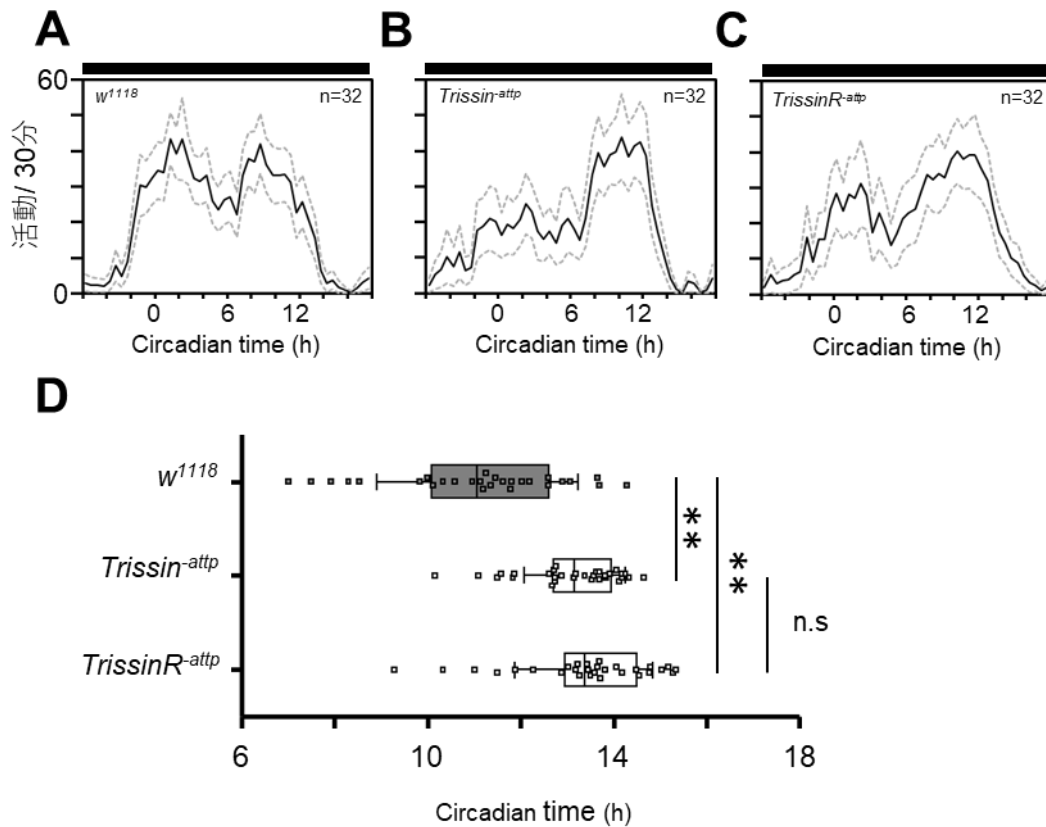


図 2 Trissin/TrissinR 経路による夕方活動オフセットの調節

(A) *w¹¹¹⁸* コントロール、(B) *Trissin-attp*、(C) *TrissinR-attp* 系統の DD 1 日目、20℃における活動パターン。(D) 各個体の夕方活動オフセットを示した、箱ひげ図。Kolmogorov–Smirnov 検定後、多重比較検定として 1 元配置分散分析 (ANOVA) を行い、2 群間の比較として Tukey 検定を実施した。** $p < 0.01$ 、n.s は統計的に有意でないことを示す。

さらに、時計細胞における *Trissin*、*TrissinR* の機能を調べるために、*Clk856-Gal4* 系統を用い、時計細胞における *Trissin* または *TrissinR* の遺伝子ノックダウンを行い、行動解析を行った。*Trissin* ノックダウンの効率は免疫染色によって確認された（補足図 3）。行動解析の結果、*Trissin*、*TrissinR* のノックダウンは、突然変異体と同様に E 活動オフセットがコントロール系統と比較して有意に遅延していた（図 3A, B, E）。先行研究では、*TrissinR* が DN1 (DN1a、DN1p)、LNd の両方で発現していることが示されている (Abruzzi et al., 2017; Ma et al., 2021)。従って、DN1 または LNd 特異的な *TrissinR* ノックダウンを行い、どの時計細胞群が E 活動オフセットの制御に関わっているのかを調べた。その結果、LNd での *TrissinR* ノックダウンにより E 活動オフセットが有意に遅延した。その一方で、DN1 でのノックダウンでは E 活動オフセットの遅延は見られなかった（図 3C–E）。これらの結果から、LNd における *Trissin* と *TrissinR* が E 活動オフセットのタイミングを調節していることが示唆された。

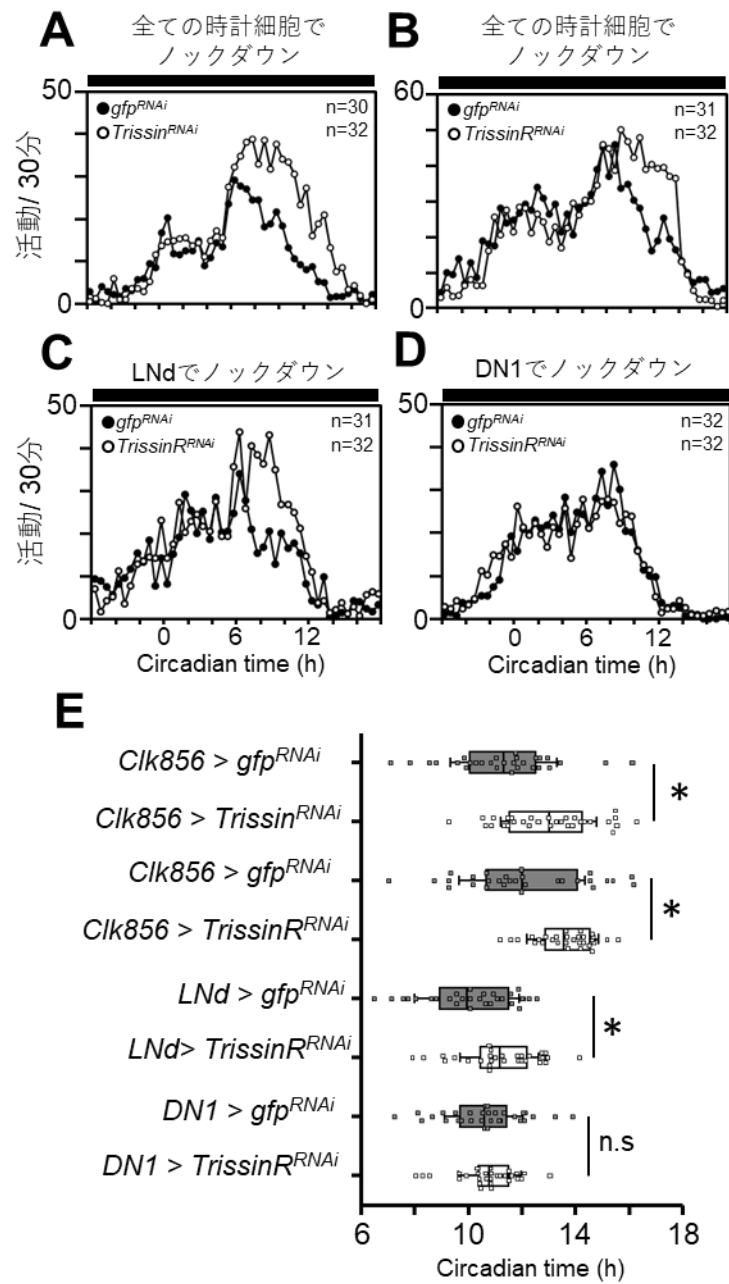


図 3 時計ネットワークにおける *Trissin/TrissinR* シグナル伝達経路による夕方活動オフセットの調節

DD1 日目、20°Cにおける *Trissin*、または *TrissinR* ノックダウン系統の活動パターン（白丸）をコントロール系統である *gfp* ノックダウン系統（黒丸）と比較した。黒いバーは暗期を示す。(A,B) *Clk856-Gal4* を用いてすべての時計細胞の *Trissin*、*TrissinR* ノックダウン。(C) *R73B06-Gal4* を用いた LNd の *TrissinR* ノックダウン。(D) *Clk4.1M-Gal4* を用いた DN1 の *TrissinR* ノックダウン。(E) 各個体の夕方活動オフセットを示した箱ひげ図。Kolmogorov–Smirnov 検定後、多重比較検定として 1 元配置分散分析（ANOVA）を行い、2 群間の比較として Tukey 検定を実施した。* $p < 0.05$ 、n.s は統計的に有意でないことを示す。

2.4.4 Trissin と ITP の相互作用が E 活動のオフセットを調節する

ITP は E 活動レベルの調節に関与し、DD 条件下における周期を短縮する効果がある神経ペプチドとして知られている。また、ITP は Trissin 陰性の一つの LN_d と 5th LN_v (E2 ニューロン) で発現している (Hermann-Luibl et al., 2014)。Trissin と ITP の関係が E 活動のオフセットに与える影響を調べるために、*Trissin*、*ITP* の単一ノックダウン系統に加えて、二重ノックダウン系統を用いた。その結果、*Trissin* ノックダウン系統では、E 活動オフセットが有意に遅延し、*ITP* ノックダウン系統では E 活動オフセットが遅延していなかった (図 4A, B, E)。その一方で、*Trissin* と *ITP* を同時にノックダウンした系統では E 活動のオフセットは遅延しなかった (図 4D, E)。これらの結果は、*Trissin* ノックダウン系統の表現型が *ITP* のさらなるノックダウンにより回復することを示唆している。

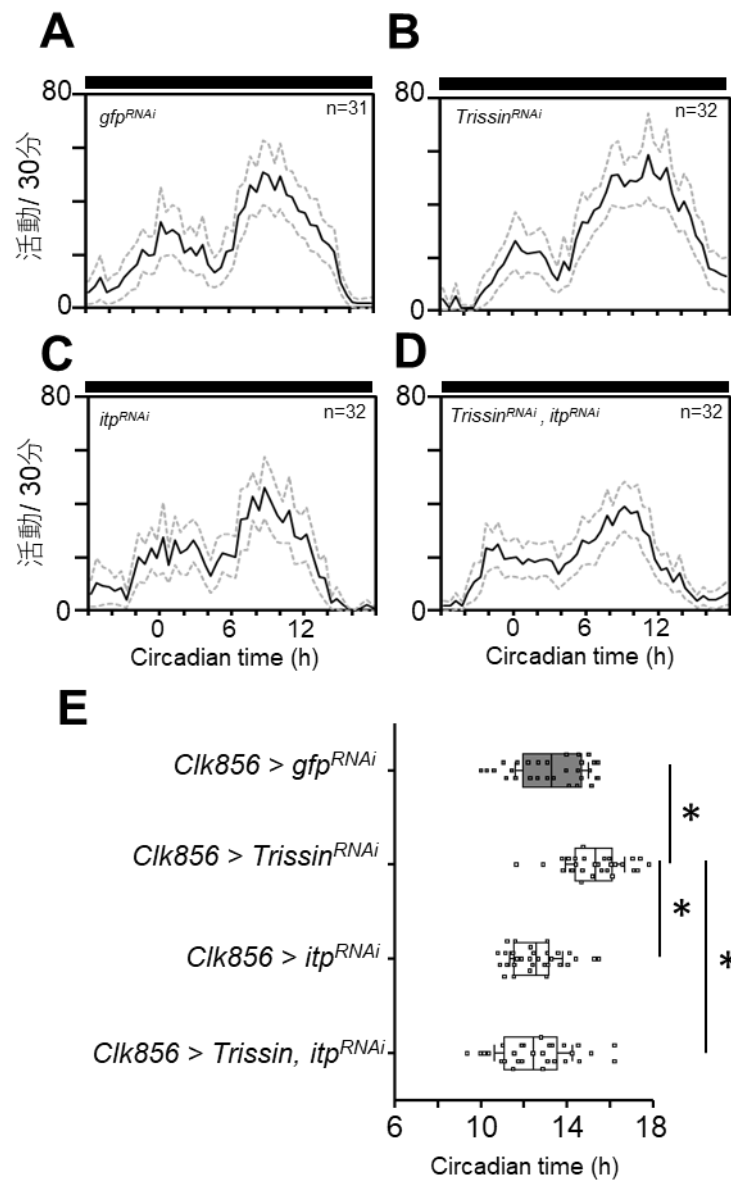
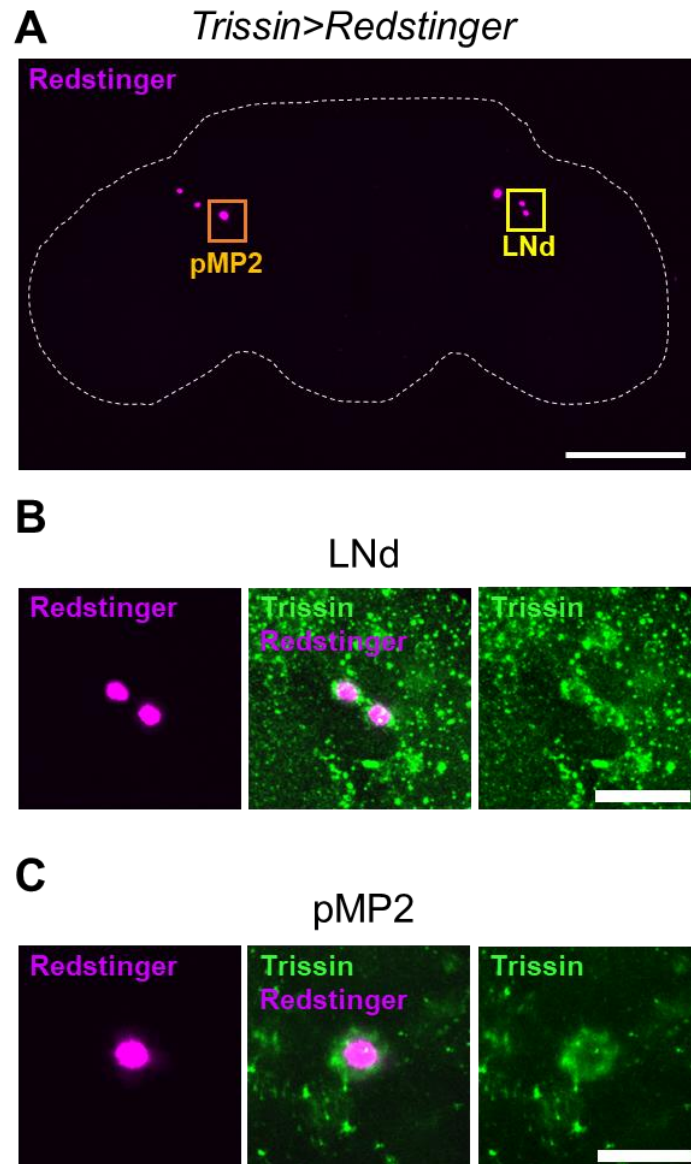


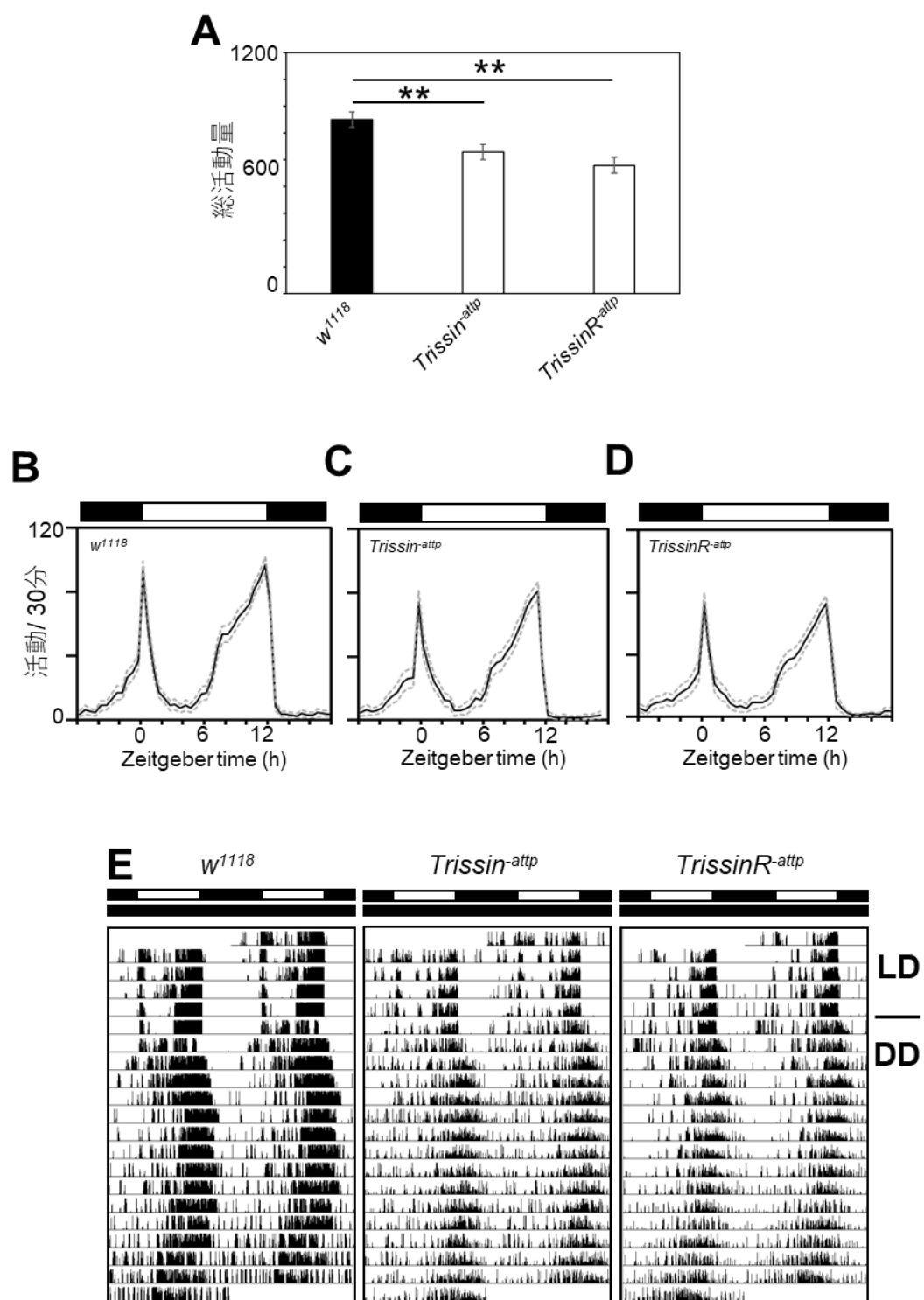
図4 夕方活動オフセット調節経路における *Trissin* と *ITP* の役割

DD1 日目、20℃における(A) *gfp*, (B) *Trissin*, (C) *itp*, (D) *Trissin* and *itp* ノックダウン系統の活動パターン。黒いバーは暗期を示す。(A,B) *Clk856-Gal4* を用いてすべての時計細胞の *Trissin*、*TrissinR* ノックダウン (E) 各個体の夕方活動オフセットを示した箱ひげ図。Kolmogorov–Smirnov 検定後、多重比較検定として 1 元配置分散分析 (ANOVA) を行い、2 群間の比較として Tukey 検定を実施した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$



補足図 1 抗 Trissin 前駆体抗体を用いた Trissin 前駆体の標識

(A) *Trissin-Gal4* により *Redstinger* を発現する Trissin 陽性細胞の核（マゼンタ）を可視化した。スケールバー = 100 μm 。オレンジ色と黄色の四角はそれぞれ pMP2 と二つの LNd を示している。(B,C)抗 Trissin 前駆体抗体で染色し、Trissin 前駆体（緑）と核と共に標識した *Trissin>Redstinger* の脳の拡大図。(B) は LNd を示し、(C) は pMP2 を示している。スケールバー = 20 μm 。



補足図 2 Trissin と TrissinR ノックアウト系統の活動パターン

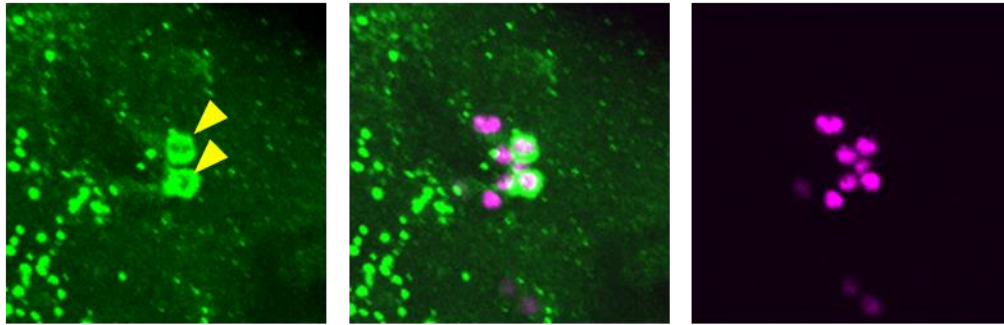
(A) LD 条件下における w^{1118} コントロール、 $Trissin^{-attp}$ 、 $TrissinR^{-attp}$ の 1 日の総活動量（平均 $\pm$ 標準誤差）。(B, C, D) LD 条件下 5 日間におけるショウジョウバエの活動パターン：

(B) w^{1118} 、(C) $Trissin^{-attp}$ 、(D) $TrissinR^{-attp}$ 。(E) w^{1118} コントロール、 $Trissin^{-attp}$ 、 $TrissinR^{-attp}$

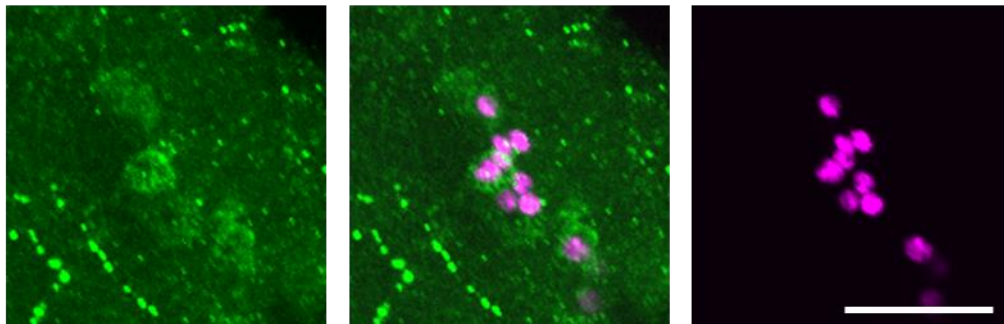
の平均アクトグラム。Kolmogorov–Smirnov 検定後、多重比較検定として 1 元配置分散分析

(ANOVA) を行い、2 群間の比較として Tukey 検定を実施した。*** $p < 0.01$

Clk856 > gfp^{RNAi}



Clk856 > Trissin^{RNAi}



補足図 3 Trissin 前駆体ノックダウンの確認

LNd を標識するために、*Clk856>Redstinger* を用いた。コントロール(*gfp RNAi* 系統)では、Trissin 前駆体と Redstinger は共発現している（上図）。一方で、*Trissin RNAi* 系統では、Trissin 前駆体のシグナルが失われている（下図）。黄色の矢頭は Trissin-LNd を示す。スケールバー = 20 μ m。

系統	n	周期 (h) ± 標準誤差	リズム強度 ± 標準誤差	R (%)
w^{1118}	32	24.3 ± 0.1	235.1 ± 11.2	96.9
<i>Trissin-attp</i>	31	24.0 ± 0.0	264.3 ± 13.1	100.0
<i>TrissinR-attp</i>	26	23.8 ± 0.0	199.2 ± 12.4	86.7

補足表 1

w^{1118} コントロール、*Trissin-attp*、*TrissinR-attp* の自由継続リズム。全ての系統で約 24 時間のリズムが確認された。

2.5. 考察

ショウジョウバエにおいて、朝方 (M)、夕方 (E)の活動を独立して制御する時計細胞が同定されて以来、これらは M 細胞、E 細胞として分類されている (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004)。M 細胞に比べて、E 細胞は神経ペプチドの発現においてより複雑である。具体的には、E1 ニューロンは Trissin と sNPF を、E2 ニューロンは NPF と ITP を、E3 ニューロンは NPF を発現している (Ma et al., 2021)。E 細胞の機能解析により、これらは主に E 活動の制御に関与していることが明らかにされているが、E 活動がどのように調節されているのかは未だに解明されていない。本研究では、Trissin が E 活動のオフセットを調節する可能性を提案し、その解析を行った。

Trissin 前駆体発現リズムの解析より、Trissin 前駆体の発現は朝に高く、夜に低いことを示した (図 1D)。この結果から、Trissin-LNd は Trissin を介して朝方に時計情報を伝達している可能性が考えられる。特に、朝の高い Trissin 発現は、TrissinR を発現する DN1、E 細胞での高い発火頻度と一致している (Guo et al., 2017)。

行動リズムの解析から、ショウジョウバエにおいて Trissin が E 活動オフセットに影響を与えることが明らかになった。しかし、朝方の Trissin シグナルが直接 E 活動を調節する可能性は考えにくい。むしろ、Trissin シグナルは他のシグナル伝達経路によって仲介されていると考えられる。その主要な候補が ITP であると考えた。先行研究によると、ITP の発現は、昼間と深夜にピークに達する (Hermann-Luibl et al., 2014)。Trissin ノックダウン系統で観察された E 活動オフセットの遅延は、Trissin、ITP の二重ノックダウンによって回復した。従って、Trissin シグナルが ITP シグナルを抑制することで、E 活動オフセットが生み出されている可能性が考えられる。実施した Trissin、ITP の二重ノックダウンでは、2つの UAS 配列に GAL4 タンパク質が結合することになる。従って、単一ノックダウン系統と比べてノックダウン効率が低下している可能性が考えられる。今後の研究では

Gal4 遺伝子をホモ接合でもつ系統を用い、*GAL4* タンパク質の量的な問題による影響を排除した状態で詳細な機能解析を行う必要がある。

Allatostatin C (AstC)は、E 活動のオフセット調節に関与するとされる神経ペプチドである。AstC は、DN1、DN3、LPN で発現し、そのシグナルは AstC 受容体である AstCR2 を発現する E3 ニューロンに伝達される。AstC、または AstCR2 のノックダウン系統では、短日または長日条件下で E 活動オフセットに遅延が観察された。さらに、AstC は E3 ニューロンの一つで神経活動を抑制し、この抑制が E 活動オフセットの正常な調節を妨げることが報告されている (Díaz et al., 2019)。

Trissin/TrissinR、AstC/AstCR2 のシグナル伝達経路は、E 活動オフセット調節において類似した機能を共有している。しかし、この 2 つのシグナル伝達経路は独立した経路で E 活動オフセットを制御していると考えられる。具体的には、E1、E2 ニューロンは *Pigment-dispersing factor* 受容体 (*Pdfr*)を発現していることから、神経ペプチド *Pigment dispersing factor* (PDF)を介した情報伝達が可能である (Im & Taghert, 2010)。特に、PDF 細胞の分子リズムを変化させることで E1 ニューロンの PERIOD の発現リズムに影響を与えることが知られている (Yao & Shafer, 2014)。一方で、AstCR2 を発現する E3 ニューロンは PDFR を発現しておらず、PDF の直接的な影響を受けていないことを示している。従って、Trissin と AstC のシグナル伝達経路は独立して E 活動オフセットを調節する可能性が考えられる。今後の研究として、E 活動オフセットの制御を担う Trissin と AstC の下流に存在するシグナル伝達経路を特定し、それぞれが独立した経路なのかを検証する必要がある。

本研究結果から、E 活動の調節は複数の神経ペプチドによる複合的な制御が考えられる。Trissin-LNd は時計シグナルである Trissin を TrissinR 発現 LNd に伝達する。その後、ITP シグナルがさらに E 活動オフセットを調節する可能性がある。このシグナル伝達経路の役割は、ショウジョウ時計神経ネットワーク研究の前進に寄与すると考えられる。

総括

本研究では、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を用いて、1) 時計細胞の網羅的機能解析、2) 時計細胞で発現するシグナル伝達経路の機能解析を実施した。本研究により、時計細胞間の神経ネットワークが概日活動リズムの制御に重要という“時計神経ネットワーク説”を支持する結果が得られた。加えて、4つの DN1p だけで朝方 (M)、夕方 (E) ピーク、自由継続リズムの形成をある程度制御できることを明らかにした。また、神経ペプチド Trissin とその受容体である TrissinR は DD 条件下における活動オフセットの制御を担っていることを明らかにした。

概日時計は、時計遺伝子を発現する時計細胞からなる神経ネットワークにより制御されている。時計遺伝子は種を超えて保存されており、その分子メカニズムもシアノバクテリアからヒトに至る幅広い生物で共通である(Ouyang et al., 1998; Paranjpe & Sharma, 2005)。時計神経ネットワーク研究では、小型かつ、比較的シンプルであるショウジョウバエで最も研究が進んでいる。例えば、近年ではショウジョウバエの神経伝達物質の発現パターンはほぼ解明された。また、脳内のコネクトームデータベースの完成により、シナプス接続経路も簡単に調べられるようになった(Dorkenwald et al., 2023; Reinhard et al., 2023; Schlegel et al., 2023)。しかし、時計神経ネットワークを構成する時計細胞の機能解析では、主に古典的な少数の Gal4 系統が使われていたことから、一部の時計細胞以外の機能は軽視されていたのが現状である。この状況を改善するために、本研究の第一章では、時計細胞特異的な Gal4 系統を用いて、時計細胞の網羅的機能解析を実施した。具体的には、時計細胞特異的に遺伝子操作が可能な Gal4 系統コレクション(Sekiguchi et al., 2020)を用いて、*per*⁰¹ 時計突然変異体に対して、特定の時計細胞にだけ *per* レスキューしたショウジョウバエの行動リズムを観察した。その結果、先行研究(Chatterjee et al., 2018; Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004)で報告されている、朝方 (M) 振動体と夕方 (E) 振動体からなる 2 振動体モデルを指示する結果が得られた。一方で、M 振動体と分類されてい

た CRY 陽性 DN1p が M、E ピークを形成できた。また、M 細胞である s-LNv が主として DD 条件下における自由継続リズムの維持に関わること（階層性の制御）を再確認した。一方で、E 細胞や DN1p もある程度 DD 条件下における自由継続リズムを維持できるという階層性の制御では説明しきれない現象が観察された。これらの結果は、ショウジョウバエ概日時計において、それぞれの時計細胞が特定の役割を主として担っているが、全ての機能が特定の細胞に集中しているわけではなく、時計機能は脳の複数の領域に分散していることを示している。

本研究の第 2 章では、時計細胞で発現する神経ペプチド Trissin とその受容体である TrissinR の時計神経ネットワークにおける機能解析を実施した。神経ネットワークのメカニズムを理解するためには、神経伝達物質の機能を明らかにすることが必要不可欠である。ショウジョウバエ時計神経ネットワークにおいて、これまでに多数の神経伝達物質の関与が報告されている (Yoshii & Fukuda, 2023)。しかし、時計細胞で発現するいくつかの神経ペプチドの機能解析は進んでいなかった。本研究では、Trissin と TrissinR の機能解析を行い、分子レベルでは、Trissin に発現リズムがあることを示し、行動レベルでは、E 活動オフセットの制御を担っていることを初めて明らかにした。本研究の後に、Trissin 陽性の E1 ニューロンが E 活動オフセットの促進に関わるということが別の研究により報告されている (Brown et al., 2024)。

今後の研究として、1)の研究では CRY 陽性 DN1p による活動制御のメカニズムの解明、2)の研究では、夕方活動オフセットの制御に関わる Trissin/TrissinR シグナル伝達経路の下流に存在する経路の探索が望まれる。概日時計のメカニズムは、幅広い生物種で保存されている。ショウジョウバエのような比較的シンプルなモデルにおける知見は、より複雑な脳を持つ動物の時計神経ネットワーク研究へ貢献することが期待できる。

謝辞

学部から博士後期課程に渡り、実に多くの方にお世話になりました。この場を借りて、感謝の意を述べさせていただきます。

はじめに、学部から博士後期課程まで指導していただいた指導教官の吉井大志先生に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、共同研究者のドイツ・Würzburg 大学、Helfrich-Förster 先生とラボの皆様、および九州大学、伊藤太一先生に深く感謝を申し上げます。

次に、本論文の作成にあたり、有益なご助言およびご校閲を頂いた副査の中越英樹先生、坂本浩隆先生に深く感謝を申し上げます。

最後に、吉井研究室の皆様には大変お世話になりました。この場を借りて深く感謝いたします。

引用文献

- Abruzzi, K. C., Zadina, A., Luo, W., Wiyanto, E., Rahman, R., Guo, F., Shafer, O., & Rosbash, M. (2017). RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides. *PLoS Genetics*, 13(2), e1006613.
- Allada, R., White, N. E., So, W. V., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, 93(5), 791–804.
- Ariyapala, I. S., Holsopple, J. M., Popodi, E. M., Hartwick, D. G., Kahsai, L., Cook, K. R., & Sokol, N. S. (2020). Identification of split-GAL4 drivers and enhancers that allow regional cell type manipulations of the *Drosophila melanogaster* intestine. *Genetics*, 216(4), 891–903.
- Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., & Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *Journal of Neurogenetics*, 23(1–2), 156–172.
- Bachleitner, W., Kempinger, L., Wülbeck, C., Rieger, D., & Helfrich-Förster, C. (2007). Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(9), 3538–3543.

Bahn, J. H., Lee, G., & Park, J. H. (2009). Comparative analysis of Pdf-mediated circadian behaviors between *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics*, 181(3), 965–975.

Beer, K., & Helfrich-Förster, C. (2020). Model and non-model insects in chronobiology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 601676.

Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chélot, E., Hardin, P. E., Prémat, T., & Rouyer, F. (2001). Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian rhythms in motor activity and eclosion by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *The European Journal of Neuroscience*, 13(5), 871–888.

Blau, J., & Young, M. W. (1999). Cycling *vriille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, 99, 661–671.

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415.

Brown, M. P., Verma, S., Palmer, I., Guerrero Zuniga, A., Mehta, A., Rosensweig, C., Keles, M. F., & Wu, M. N. (2024). A subclass of evening cells promotes the switch from arousal to sleep at dusk. *Current Biology*, 34(10), 2186-2199.e3.

- Brown, S. A., Kowalska, E., & Dallmann, R. (2012). (Re)inventing the circadian feedback loop. *Developmental Cell*, 22(3), 477–487.
- Buhr, E. D., Yoo, S.-H., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379–385.
- Bulthuis, N., Spontak, K. R., Kleeman, B., & Cavanaugh, D. J. (2019). Neuronal Activity in Non-LNV Clock Cells Is Required to Produce Free-Running Rest:Activity Rhythms in *Drosophila*. *Journal of Biological Rhythms*, 34(3), 249–271.
- Ceriani, M. F., Darlington, T. K., Staknis, D., Más, P., Petti, A. A., Weitz, C. J., & Kay, S. A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, 285(5427), 553–556.
- Chatterjee, A., Lamaze, A., De, J., Mena, W., Chélot, E., Martin, B., Hardin, P., Kadener, S., Emery, P., & Rouyer, F. (2018). Reconfiguration of a Multi-oscillator Network by Light in the *Drosophila* circadian clock. *Current Biology*, 28(13), 2007-2017.e4.
- Chen, J., Reiher, W., Hermann-Luibl, C., Sellami, A., Cognigni, P., Kondo, S., Helfrich-Förster, C., Veenstra, J. A., & Wegener, C. (2016). Allatostatin A signalling in *Drosophila* regulates feeding and sleep and is modulated by PDF. *PLoS Genetics*, 12(9), e1006346.

- Cheng, Y., & Hardin, P. E. (1998). *Drosophila* photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without *period* mRNA cycling. *The Journal of Neuroscienc*, 18(2), 741–750.
- Cusumano, P., Klarsfeld, A., Chélot, E., Picot, M., Richier, B., & Rouyer, F. (2009). PDF-modulated visual inputs and cryptochrome define diurnal behavior in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 12(11), 1431–1437.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M.-C., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V., & Blau, J. (2003). *vrille*, *Pdp1*, and *dClock* Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 112(3), 329–341.
- Daan, S., & Pittendrigh, C. S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*, 106, 253–266.
- Delventhal, R., O'Connor, R. M., Pantalia, M. M., Ulgherait, M., Kim, H. X., Basturk, M. K., Canman, J. C., & Shirasu-Hiza, M. (2019). Dissection of central clock function in *Drosophila* through cell-specific CRISPR-mediated clock gene disruption. *eLife*, 8, e48308.
- Deng, B., Li, Q., Liu, X., Cao, Y., Li, B., Qian, Y., Xu, R., Mao, R., Zhou, E., Zhang, W., Huang, J., & Rao, Y. (2019). Chemoconnectomics: Mapping Chemical Transmission in *Drosophila*. *Neuron*, 101(5), 876-893.e4.

- Depetris-Chauvin, A., Berni, J., Aranovich, E. J., Muraro, N. I., Beckwith, E. J., & Ceriani, M. F. (2011). Adult-specific electrical silencing of pacemaker neurons uncouples molecular clock from circadian outputs. *Current Biology*, 21(21), 1783–1793.
- Díaz, M. M., Schlichting, M., Abruzzi, K. C., Long, X., & Rosbash, M. (2019). Allatostatin-C/AstC-R2 Is a Novel Pathway to Modulate the Circadian Activity Pattern in *Drosophila*. *Current Biology*, 29(1), 13–22.e3.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., & Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150), 151–156.
- Dorkenwald, S., Matsliah, A., Sterling, A. R., Schlegel, P., Yu, S.-C., McKellar, C. E., Lin, A., Costa, M., Eichler, K., Yin, Y., Silversmith, W., Schneider-Mizell, C., Jordan, C. S., Brittain, D., Halageri, A., Kuehner, K., Ogedengbe, O., Morey, R., Gager, J., ... FlyWire Consortium. (2023). Neuronal wiring diagram of an adult brain. *bioRxiv*.
- Dreyer, A. P., Martin, M. M., Fulgham, C. V., Jabr, D. A., Bai, L., Beshel, J., & Cavanaugh, D. J. (2019). A circadian output center controlling feeding:fasting rhythms in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 15(11), e1008478.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–290.

Dunlap, J. C., Loros, J. J., & DeCoursey, P. J. (Eds.). (2004). *Chronobiology: Biological timekeeping*. Sinauer Associates.

Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5), 669–679.

Fernández, M. P., Berni, J., & Ceriani, M. F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biology*, 6(3), e69.

Fernandez, M. P., Pettibone, H. L., Bogart, J. T., Roell, C. J., Davey, C. E., Pranevicius, A., Huynh, K. V., Lennox, S. M., Kostadinov, B. S., & Shafer, O. T. (2020). Sites of circadian clock neuron plasticity mediate sensory integration and entrainment. *Current Biology*, 30(12), 2225–2237.e5.

Flourakis, M., Kula-Eversole, E., Hutchison, A. L., Han, T. H., Aranda, K., Moose, D. L., White, K. P., Dinner, A. R., Lear, B. C., Ren, D., Diekman, C. O., Raman, I. M., & Allada, R. (2015). A conserved bicycle model for circadian clock control of membrane excitability. *Cell*, 162(4), 836–848.

Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression* (3rd ed.). SAGE Publications.

- 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. (2017). Organization of circadian behavior relies on glycinergic transmission. *Cell Reports*, 19(1), 72–85.
- Fujiwara, Y., Hermann-Luibl, C., Katsura, M., Sekiguchi, M., Ida, T., Helfrich-Förster, C., & Yoshii, T. (2018). The CCHamide1 neuropeptide expressed in the anterior dorsal neuron 1 conveys a circadian signal to the ventral lateral neurons in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 9, 1276.
- Gaston, S., & Menaker, M. (1968). Pineal function: The biological clock in the sparrow? *Science*, 160(3832), 1125–1127.
- Glossop, N. R. J., Houl, J. H., Zheng, H., Ng, F. S., Dudek, S. M., & Hardin, P. E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*, 37(2), 249–261.
- Gmeiner, F., Kołodziejczyk, A., Yoshii, T., Rieger, D., Nässel, D. R., & Helfrich-Förster, C. (2013). GABA(B) receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 216(20), 3837–3843.

- Grima, B., Chélot, E., Xia, R., & Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 431(7010), 869–873.
- Gummadova, J. O., Coutts, G. A., & Glossop, N. R. J. (2009). Analysis of the *Drosophila* Clock promoter reveals heterogeneity in expression between subgroups of central oscillator cells and identifies a novel enhancer region. *Journal of Biological Rhythms*, 24(5), 353–367.
- Guo, F., Cerullo, I., Chen, X., & Rosbash, M. (2014). PDF neuron firing phase-shifts key circadian activity neurons in *Drosophila*. *eLife*, 3.e02780.
- Guo, F., Chen, X., & Rosbash, M. (2017). Temporal calcium profiling of specific circadian neurons in freely moving flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(41), E8780–E8787.
- Guo, F., Holla, M., Díaz, M. M., & Rosbash, M. (2018). A Circadian Output Circuit Controls Sleep-Wake Arousal in *Drosophila*. *Neuron*, 100(3), 624–635.e4.
- Guo, F., Yu, J., Jung, H. J., Abruzzi, K. C., Luo, W., Griffith, L. C., & Rosbash, M. (2016). Circadian neuron feedback controls the *Drosophila* sleep-activity profile. *Nature*, 536(7616), 292–297.

Hamasaka, Y., Rieger, D., Parmentier, M.-L., Grau, Y., Helfrich-Förster, C., & Nässel, D. R.

(2007). Glutamate and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits.

The Journal of Comparative Neurology, 505(1), 32–45.

Hao, H., Allen, D. L., & Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-

dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular*

Biology, 17(7), 3687–3693.

Hardin, P. E. (2005). The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Current Biology*,

15(17), 714–722.

Hardin, P. E. (2011). Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*.

Advances in Genetics, 74, 141–173.

Harrisingh, M. C., Wu, Y., Lnenicka, G. A., & Nitabach, M. N. (2007). Intracellular Ca²⁺

regulates free-running circadian clock oscillation in vivo. *The Journal of Neuroscienc*,

27(46), 12489–12499.

Helfrich, C., & Engelmann, W. (1987). Evidences for circadian rhythmicity in the per0

mutant of *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of*

biosciences, 42(11-12), 1335–1338.

- Helfrich-Förster C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *Journal of Comparative Physiology*, 182(4), 435–453.
- Helfrich-Förster, C. (2000). Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - Sex-specific differences suggest a different quality of activity. *Journal of Biological Rhythms*, 15(2), 135–154.
- Helfrich-Förster, C. (2003). The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microscopy Research and Technique*, 62(2), 94–102.
- Helfrich-Förster, C, Shafer, O. T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., & Taghert, P. (2007). Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(1), 47–70.
- Helfrich-Förster, C, Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C., & Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, 30(1), 249–261.
- Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V., & Helfrich-Förster, C. (2012). Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(5), 970–987.

Hermann-Luibl, C., Yoshii, T., Senthilan, P. R., Dirksen, H., & Helfrich-Förster, C. (2014).

The ion transport peptide is a new functional clock neuropeptide in the fruit fly

Drosophila melanogaster. *The Journal of Neuroscience*, 34(29), 9522–9536.

Hughes, M. E., Hong, H. K., Chong, J. L., Indacochea, A. A., Lee, S. S., Han, M.,

Takahashi, J. S., & Hogenesch, J. B. (2012). Brain-specific rescue of Clock reveals

system-driven transcriptional rhythms in peripheral tissue. *PLoS Genetics*, 8(7),

e1002835.

Hut, R. A., & Beersma, D. G. (2011). Evolution of time-keeping mechanisms: early

emergence and adaptation to photoperiod. *Philosophical transactions of the Royal*

Society of London. Series B, Biological sciences, 366(1574), 2141–2154.

Im, S. H., & Taghert, P. H. (2010). PDF receptor expression reveals direct interactions

between circadian oscillators in *Drosophila*. *The Journal of Comparative*

Neurology, 518(11), 1925–1945.

Jaumouillé, E., Koch, R., & Nagoshi, E. (2021). Uncovering the Roles of Clocks and Neural

Transmission in the Resilience of *Drosophila* Circadian Network. *Frontiers in*

physiology, 12, 663339.

Jenett, A., Rubin, G. M., Ngo, T. T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B. D.,

Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., Iyer, N., Fetter, D., Hausenfluck, J. H., Peng, H.,

- Trautman, E. T., Svirskas, R. R., Myers, E. W., Iwinski, Z. R., Aso, Y., DePasquale, G. M., ... Zugates, C. T. (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Reports*, 2(4), 991–1001.
- Johard, H. A., Yoishii, T., Dirksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Förster, C., & Nässel, D. R. (2009). Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 516(1), 59–73.
- Joshi, R., Cai, Y. D., Xia, Y., Chiu, J. C., & Emery, P. (2022). PERIOD Phosphoclusters Control Temperature Compensation of the *Drosophila* Circadian Clock. *Frontiers in Physiology*, 13, 888262.
- Kaneko, H., Head, L. M., Ling, J., Tang, X., Liu, Y., Hardin, P. E., Emery, P., & Hamada, F. N. (2012). Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*. *Current Biology*, 22(19), 1851–1857.
- Kaneko, M., & Hall, J. C. (2000). Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 422(1), 66–94.

- King, A. N., & Sehgal, A. (2020). Molecular and circuit mechanisms mediating circadian clock output in the *Drosophila* brain. *The European Journal of Neuroscience*, 51(1), 268–281.
- Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., & Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell*, 94(1), 97–107.
- Koh, K., Evans, J. M., Hendricks, J. C., & Sehgal, A. (2006). A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13843–13847.
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2112–2116.
- Kramer, J. M., & Staveley, B. E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 43–47.
- Kuhlman, S. J., Craig, L. M., & Duffy, J. F. (2018). Introduction to Chronobiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9), a033613.

- Kunst, M., Hughes, M. E., Raccuglia, D., Felix, M., Li, M., Barnett, G., Duah, J., & Nitabach, M. N. (2014). Calcitonin gene-related peptide neurons mediate sleep-specific circadian output in *Drosophila*. *Current Biology*, 24(22), 2652–2664.
- Kurosawa, G., & Iwasa, Y. (2005). Temperature compensation in circadian clock models. *Journal of Theoretical Biology*, 233(4), 453–468.
- Kuwano, R., Katsura, M., Iwata, M., Yokosako, T., & Yoshii, T. (2023). Pigment-dispersing factor and CCHamide1 in the *Drosophila* circadian clock network. *Chronobiology International*, 40(3), 284–299.
- Lamaze, A., Krätschmer, P., Chen, K. F., Lowe, S., & Jepson, J. E. C. (2018). A Wake-Promoting Circadian Output Circuit in *Drosophila*. *Current Biology*, 28(19), 3098–3105.e3.
- Lamaze, Angelique, Öztürk-Çolak, A., Fischer, R., Peschel, N., Koh, K., & Jepson, J. E. C. (2017). Regulation of sleep plasticity by a thermo-sensitive circuit in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 7, 40304.
- Lamaze, A., & Stanewsky, R. (2020). DN1p or the "Fluffy" Cerberus of Clock Outputs. *Frontiers in Physiology*, 10, 1540.

- Lear, B. C., Zhang, L., & Allada, R. (2009). The neuropeptide PDF acts directly on evening pacemaker neurons to regulate multiple features of circadian behavior. *PLoS Biology*, 7(7), e1000154.
- Lee, C., Bae, K., & Edery, I. (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5316–5325.
- Liang, X., Holy, T. E., & Taghert, P. H. (2016). Synchronous *Drosophila* circadian pacemakers display nonsynchronous Ca^{2+} rhythms in vivo. *Science*, 351(6276), 976–981.
- Lin, Y., Stormo, G. D., & Taghert, P. H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *The Journal of Neuroscience*, 24(36), 7951–7957.
- Lorber, C., Leleux, S., Stanewsky, R., & Lamaze, A. (2022). Light triggers a network switch between circadian morning and evening oscillators controlling behaviour during daily temperature cycles. *PLoS Genetics*, 18(11), e1010487.

- Luan, H., Peabody, N. C., Vinson, C. R., & White, B. H. (2006). Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron*, 52(3), 425–436.
- Ma, D., Przybylski, D., Abruzzi, K. C., Schlichting, M., Li, Q., Long, X., & Rosbash, M. (2021). A transcriptomic taxonomy of *Drosophila* circadian neurons around the clock. *eLife*, 10, e63056.
- Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P. E., & Edery, I. (1999). How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron*, 24(1), 219–230.
- Marin, E. C., Büld, L., Theiss, M., Sarkissian, T., Roberts, R. J. V., Turnbull, R., Tamimi, I. F. M., Pleijzier, M. W., Laursen, W. J., Drummond, N., Schlegel, P., Bates, A. S., Li, F., Landgraf, M., Costa, M., Bock, D. D., Garrity, P. A., & Jefferis, G. S. X. E. (2020). Connectomics Analysis Reveals First-, Second-, and Third-Order Thermosensory and Hygrosensory Neurons in the Adult *Drosophila* Brain. *Current Biology*, 30(16), 3167–3182.e4.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., & Young, M. W. (2001). A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 105(6), 769–779.

- Matsumoto, A., Tomioka, K., Chiba, Y., & Tanimura, T. (1999). *timrit* Lengthens circadian period in a temperature-dependent manner through suppression of PERIOD protein cycling and nuclear localization. *Molecular and Cellular Biology*, 19(6), 4343–4354.
- Menegazzi, P., Beer, K., Grebler, V., Schlichting, M., Schubert, F. K., & Helfrich-Förster, C. (2020). A Functional Clock Within the Main Morning and Evening Neurons of *D. melanogaster* Is Not Sufficient for Wild-Type Locomotor Activity Under Changing Day Length. *Frontiers in Physiology*, 11, 229.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206.
- Nettnin, E. A., Sallese, T. R., Nasser, A., Saurabh, S., & Cavanaugh, D. J. (2021). Dorsal clock neurons in *Drosophila* sculpt locomotor outputs but are dispensable for circadian activity rhythms. *iScience*, 24(9), 103001.
- Ni, J. D., Gurav, A. S., Liu, W., Ogunmowo, T. H., Hackbart, H., Elsheikh, A., Verdegaal, A. A., & Montell, C. (2019). Differential regulation of the *Drosophila* sleep homeostat by circadian and arousal inputs. *eLife*, 8, e40487.
- Nitabach, M. N., Llamas, D. A., Thompson, I. J., Collins, K. A., & Holmes, T. C. (2002). Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation

- of shaker family voltage-gated potassium channels by SRC family protein tyrosine kinases. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 7913–7922.
- Nitabach, M. N., Wu, Y., Sheeba, V., Lemon, W. C., Strumbos, J., Zelensky, P. K., White, B. H., & Holmes, T. C. (2006). Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *The Journal of Neuroscience*, 26(2), 479–489.
- Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., & Johnson, C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8660–8664.
- Owald, D., Lin, S., & Waddell, S. (2015). Light, heat, action: neural control of fruit fly behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1677), 20140211.
- Page T. L. (1990). Circadian rhythms of locomotor activity in cockroach nymphs: free running and entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 5(4), 273–289.
- Paranjpe, D. A., & Sharma, V. K. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms*, 3(1), 7.

Park, J. H., Helfrich-Förster, C., Lee, G., Liu, L., Rosbash, M., & Hall, J. C. (2000).

Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3608–3613.

Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T. T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A.,

Carlson, J. W., Wan, K. H., Laverty, T. R., Mungall, C., Svirkas, R., Kadonaga, J.

T., Doe, C. Q., Eisen, M. B., Celniker, S. E., & Rubin, G. M. (2008). Tools for

neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9715–9720.

Pfeiffer, B. D., Ngo, T. T., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J. W., & Rubin, G.

M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in

Drosophila. *Genetics*, 186(2), 735–755.

Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., & Rouyer, F. (2007). Light activates

output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the

Drosophila circadian clock. *PLoS Biology*, 5(11), e315.

Picot, M., Klarsfeld, A., Chélot, E., Malpel, S., & Rouyer, F. (2009). A role for blind DN2

clock neurons in temperature entrainment of the *Drosophila* larval brain. *The Journal of Neuroscience*, 29(26), 8312–8320.

- Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40(10), 1018–1029.
- Pittendrigh, C. S., & Minis, D. H. (1972). Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1537–1539.
- Reinhard, N., Bertolini, E., Saito, A., Sekiguchi, M., Yoshii, T., Rieger, D., & Helfrich-Förster, C. (2022a). The lateral posterior clock neurons of *Drosophila melanogaster* express three neuropeptides and have multiple connections within the circadian clock network and beyond. *The Journal of Comparative Neurology*, 530(9), 1507–1529.
- Reinhard, N., Fukuda, A., Manoli, G., Derksen, E., Saito, A., Möller, G., Sekiguchi, M., Rieger, D., Helfrich-Förster, C., Yoshii, T., & Zandawala, M. (2023). Synaptic connectome of the *Drosophila* circadian clock. *bioRxiv*.
- Reinhard, N., Schubert, F. K., Bertolini, E., Hagedorn, N., Manoli, G., Sekiguchi, M., Yoshii, T., Rieger, D., & Helfrich-Förster, C. (2022b). The neuronal circuit of the dorsal circadian clock neurons in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 13, 886432.

- Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., & Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99(7), 791–802.
- Rieger, D., Shafer, O. T., Tomioka, K., & Helfrich-Förster, C. (2006). Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, 26(9), 2531–2543.
- Rieger, D., Stanewsky, R., & Helfrich-Förster, C. (2003). Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms*, 18(5), 377–391.
- Rieger, D., Wülbeck, C., Rouyer, F., & Helfrich-Förster, C. (2009). Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *Journal of Biological Rhythms*, 24(4), 271–282.
- Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, 93(5), 805–814.
- Scheffer, L. K., Xu, C. S., Januszewski, M., Lu, Z., Takemura, S. Y., Hayworth, K. J., Huang, G. B., Shinomiya, K., Maitlin-Shepard, J., Berg, S., Clements, J., Hubbard,

- P. M., Katz, W. T., Umayam, L., Zhao, T., Ackerman, D., Blakely, T., Bogovic, J., Dolafi, T., Kainmueller, D., ... Plaza, S. M. (2020). A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain. *eLife*, 9, e57443.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schlegel, P., Yin, Y., Bates, A. S., Dorkenwald, S., Eichler, K., Brooks, P., Han, D. S., Gkantia, M., Dos Santos, M., Munnelly, E. J., Badalamente, G., Capdevila, L. S., Sane, V. A., Pleijzier, M. W., Tamimi, I. F. M., Dunne, C. R., Salgarella, I., Javier, A., Fang, S., Perlman, E., ... Jefferis, G. S. X. E. (2023). Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing quantifies circuit stereotypy in *Drosophila*. *bioRxiv*
- Schlichting, M., Díaz, M. M., Xin, J., & Rosbash, M. (2019). Neuron-specific knockouts indicate the importance of network communication to *Drosophila* rhythmicity. *eLife*, 8, e48301.
- Schmid, B., Helfrich-Förster, C., & Yoshii, T. (2011). A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *Journal of Biological Rhythms*, 26(5), 464–467.

Schubert, F. K., Hagedorn, N., Yoshii, T., Helfrich-Förster, C., & Rieger, D. (2018).

Neuroanatomical details of the lateral neurons of *Drosophila melanogaster* support their functional role in the circadian system. *The Journal of Comparative Neurology*, 526(7), 1209–1231.

Sehgal, A., Price, J. L., Man, B., & Young, M. W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, 263(5153), 1603–1606.

Sekiguchi, M., Inoue, K., Yang, T., Luo, D. G., & Yoshii, T. (2020). A Catalog of GAL4 Drivers for Labeling and Manipulating Circadian Clock Neurons in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms*, 35(2), 207–213.

Sekiguchi, M., Katoh, S., Yokosako, T., Saito, A., Sakai, M., Fukuda, A., Itoh, T. Q., & Yoshii, T. (2024). The Trissin/TrissinR signaling pathway in the circadian network regulates evening activity in *Drosophila melanogaster* under constant dark conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 704, 149705.

Shafer, O. T., Gutierrez, G. J., Li, K., Mildenhall, A., Spira, D., Marty, J., Lazar, A. A., & Fernandez, M. P. (2022). Connectomic analysis of the *Drosophila* lateral neuron clock cells reveals the synaptic basis of functional pacemaker classes. *eLife*, 11, e79139.

- Shafer, O. T., & Taghert, P. H. (2009). RNA-interference knockdown of *Drosophila* pigment dispersing factor in neuronal subsets: the anatomical basis of a neuropeptide's circadian functions. *PloS One*, 4(12), e8298.
- Shafer, O. T., Helfrich-Förster, C., Renn, S. C., & Taghert, P. H. (2006). Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(2), 180–193.
- Sheeba, V., Fogle, K. J., & Holmes, T. C. (2010). Persistence of morning anticipation behavior and high amplitude morning startle response following functional loss of small ventral lateral neurons in *Drosophila*. *PloS One*, 5(7), e11628.
- Singh, S., Giesecke, A., Damulewicz, M., Fexova, S., Mazzotta, G. M., Stanewsky, R., & Dolezel, D. (2019). New *Drosophila* Circadian Clock Mutants Affecting Temperature Compensation Induced by Targeted Mutagenesis of *Timeless*. *Frontiers in Physiology*, 10, 1442.
- Sorkaç, A., Moşneanu, R. A., Crown, A. M., Savaş, D., Okoro, A. M., Memiş, E., Talay, M., & Barnea, G. (2023). *retro*-Tango enables versatile retrograde circuit tracing in *Drosophila*. *eLife*, 12, e85041.

- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1998). The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95(5), 681–692.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., & Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 431(7010), 862–868.
- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., & Rosbash, M. (2005). A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*, 438(7065), 238–242.
- Sun, L., Jiang, R. H., Ye, W. J., Rosbash, M., & Guo, F. (2022). Recurrent circadian circuitry regulates central brain activity to maintain sleep. *Neuron*, 110(13), 2139–2154.e5.
- Taghert, P. H., Hewes, R. S., Park, J. H., O'Brien, M. A., Han, M., & Peck, M. E. (2001). Multiple amidated neuropeptides are required for normal circadian locomotor rhythms in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6673–6686.
- Takahashi J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics*, 18(3), 164–179.

- Talay, M., Richman, E. B., Snell, N. J., Hartmann, G. G., Fisher, J. D., Sorkaç, A., Santoyo, J. F., Chou-Freed, C., Nair, N., Johnson, M., Szymanski, J. R., & Barnea, G. (2017). Transsynaptic Mapping of Second-Order Taste Neurons in Flies by trans-Tango. *Neuron*, 96(4), 783–795.e4.
- Tirian, L., & Dickson, B. J. (2017). The VT GAL4, LexA, and split-GAL4 driver line collections for targeted expression in the *Drosophila* nervous system. *bioRxiv*.
- Tomioka, K., & Chiba, Y. (1992). Tomioka, K., & Chiba, Y. (1992). Characterization of an optic lobe circadian pacemaker by in situ and in vitro recording of neural activity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 171, 1–7.
- Top, D., & Young, M. W. (2018). Coordination between Differentially Regulated Circadian Clocks Generates Rhythmic Behavior. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7), a033589.
- Vanin, S., Bhutani, S., Montelli, S., Menegazzi, P., Green, E. W., Pegoraro, M., Sandrelli, F., Costa, R., & Kyriacou, C. P. (2012). Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature*, 484(7394), 371–375.
- Vaze, K. M., & Sharma, V. K. (2013). On the adaptive significance of circadian clocks for their owners. *Chronobiology International*, 30(4), 413–433.

- Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Förster, C., Hall, J. C., & Stanewsky, R. (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Current Biology*, 13(20), 1758–1767.
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health*, 25(2), 85–93.
- Wu, Y., Cao, G., Pavlicek, B., Luo, X., & Nitabach, M. N. (2008). Phase coupling of a circadian neuropeptide with rest/activity rhythms detected using a membrane-tethered spider toxin. *PLoS Biology*, 6(11), e273.
- Yadlapalli, S., Jiang, C., Bahle, A., Reddy, P., Meyhofer, E., & Shafer, O. T. (2018). Circadian clock neurons constantly monitor environmental temperature to set sleep timing. *Nature*, 555(7694), 98–102.
- Yao, Z., & Shafer, O. T. (2014). The *Drosophila* circadian clock is a variably coupled network of multiple peptidergic units. *Science*, 343(6178), 1516–1520.
- Yao, Z., Bennett, A. J., Clem, J. L., & Shafer, O. T. (2016). The *Drosophila* Clock Neuron Network Features Diverse Coupling Modes and Requires Network-wide Coherence for Robust Circadian Rhythms. *Cell Reports*, 17(11), 2873–2881.
- Yoshii, T., & Fukuda, A. (2023). Neurocircuitry of Circadian Clocks. In H. Numata & K. Tomioka (Eds.), *Insect Chronobiology* (pp. 85–113). Springer.

Yoshii, T., Saito, A., & Yokosako, T. (2024). A four-oscillator model of seasonally adapted morning and evening activities in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*, 210(4), 527–534.

Yoshii, T., Todo, T., Wülbeck, C., Stanewsky, R., & Helfrich-Förster, C. (2008). Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(6), 952–966.

Yoshii, T., Wülbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., & Helfrich-Förster, C. (2009). The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *The Journal of Neuroscience*, 29(8), 2597–2610.

Zhang, G., & Li, Y. (2023). Temperature compensation and entrainment in cyanobacteria circadian rhythm. *Chronobiology International*, 40(6), 795–802.

Zhang, L., Chung, B. Y., Lear, B. C., Kilman, V. L., Liu, Y., Mahesh, G., Meissner, R. A., Hardin, P. E., & Allada, R. (2010a). DN1p Circadian Neurons Coordinate Acute Light and PDF Inputs to Produce Robust Daily Behavior in *Drosophila*. *Current Biology*, 20(7), 591–599.

Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P. E., & Emery, P. (2010b). Light and Temperature Control the Contribution of Specific DN1 Neurons to *Drosophila* Circadian Behavior. *Current Biology*, 20(7), 600–605.