

# コオロギの概日時計機構の研究を振り返る

富岡 憲治<sup>✉</sup>

岡山大学 学術研究院 自然科学学域

昆虫の概日時計機構の研究は前世紀半ばの神経・内分泌機構の研究に始まり、現在の分子生物学的手法による研究へと進んできた。本稿では、これまでに著者らが行ってきたコオロギを用いた時計機構の研究を概観する。神経行動学的な解析から、コオロギの概日時計は左右1対の視葉のLM-複合体（視葉板—視髄部分）にあり、左右の視葉概日時計は神経路を経て相互に同調していることが明らかとなった。概日時計の振動には時計遺伝子の周期的発現に関わるが、ハエと同様な *per/tim*-loop に加えて *cry2*-loop が含まれる。時計の光同調には複眼で発現する緑色光受容分子 Opsin-LW が必要であり、Opsin-LW からの情報は神経路を経て視葉時計に入力される。視葉時計での光リセットには、明期遅延時に機能する *Pdp1* 系と暗黒下で光誘導される *c-fos/cry* 系の2つが働いている。これらの普遍性と特殊性は興味深い課題である。

## 1. はじめに

「石に嚙りついて、冷や飯を食って苦勞してでも研究者になりたい」と思っていた私は、1980年3月に修士課程修了後、幸いなことに山口大学理学部の千葉喜彦教授に助手として採用していただいた。途中1年余りの米国留学を挟んで、23年間を山口大学で過ごした。山口大学着任時に、昆虫の体内時計の神経機構を調べる仕事を開始した。千葉教授は蚊を用いて行動リズムの適応的意義に関する研究をされていて、理学部の新設により研究室を拡充するにあたって、内分泌学的なアプローチと神経生理学のアプローチを導入しようと考えておられた。そこで、昆虫内分泌学を専門としていた遠藤克彦助教授（当時）と電気生理学を専門としていた私が採用されることとなった。材料も手法も自由に決めてよいとのことであったので、学生時代に使っていたフタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）を実験動物とすることにした。最初は、活動を記録するところから始めた。透明なプラスチックケース（約20×7×6 cm）の底部にシーソー式の床板を設置したアクトグラフを自作し、終齢幼虫を入れて、歩行活動を記録してみると、明期に活動が高い昼行性を示した。しかし、羽化後数日が経過すると、突然夜行性に逆転することが分かった（図1）。このリズム逆転は恒暗条件下でも生ずる内的なものであり、雄では誘引歌や精包作製の開始などの性成熟と軌を一にして生ずる。誘引歌は、雄コオロギが雌を誘引す

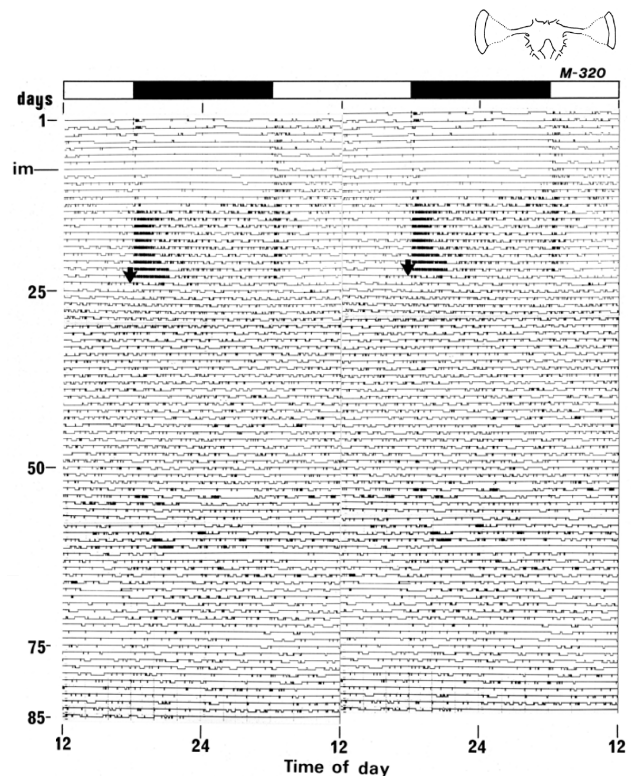


図1 フタホシコオロギ活動リズムへの視葉の切除の影響。フタホシコオロギは幼虫期には昼行性を示すが、成虫脱皮(im)後数日を経て夜行性に逆転する。矢印の時点で左右の視葉が切除されたが、視葉切除後は完全に無周期となった。記録は12時間暗、25°Cの下で行われた。活動記録図の上の白黒のバーは明(白)暗(黒)を示す。

✉ tomioka@cc.okayama-u.ac.jp

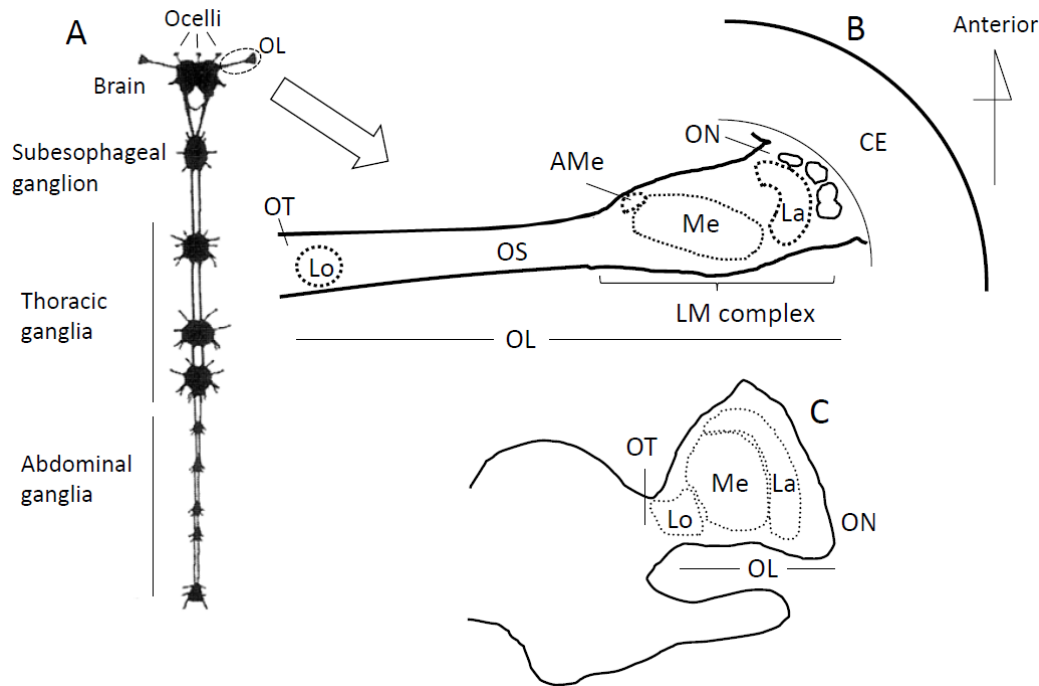


図2 コオロギ神経系 (A) と視葉 (B) およびゴキブリ視葉 (C) の模式図。  
 視葉 (OL) 内には神経線維が密に入り組んだ3つの神経叢すなわち視葉板 (La)、視髓 (Me)、副視髓 (AMe) および視小葉 (Lo) がある。視葉は複眼 (CE) と視神経 (ON) により接続し、視小葉は視神経幹 (OT) を経て脳と接続している。コオロギでは外側の視髓と視葉板 (LM-複合体) が視小葉と離れており、長い視柄 (OS) によって接続している。

るため前翅を擦り合わせて奏でるが、誘引歌の発音行動は夜間に活発に行われることから、このリズムの夜行性への逆転は生殖活動と関係すると考えられる。25°C恒暗条件下での自由継続周期は幼虫期には24時間よりも長く、成虫期には24時間よりも短い。一方、恒明条件下では無周期になるものもあるが、リズムを維持したものでは周期は24時間よりもかなり長くなった。1982年にこれらの結果を纏めて体内時計に関する最初の論文を発表した<sup>1</sup>。以後、40年にわたり多くの学生や共同研究者の協力を得て体内時計の研究を続けてきた。本稿では、特にコオロギの時計機構を中心にこれまでの研究を纏める。

## 2. コオロギ概日時計の神経機構

1980年当時、まだ昆虫では時計の所在は確定しておらず、その探究は実に興味をそそる課題であった。研究を進めるうえでの重要な情報は1968年にZ. vergl. Physiologieに出版されたNishiitsutsuji-UwoとPittendrighの論文であった。彼らは、視神経幹 (optic tract) の切断でゴキブリ (*Leucophaea maderae*) の活動リズムが消失することを報告し、視葉に時計が在る可能性を指摘していた<sup>2</sup>。そこで、まずは視葉を切除してリズムがなくなることを確認することにした。昆虫の視葉は、外側から視葉板

(lamina)、視髓 (medulla)、視小葉 (lobula) の3つの神経叢 (neuropil) を含み、視小葉から視神経幹により脳へと接続している。コオロギの場合は、外側の2つの神経叢が複眼の内側に位置し、視小葉は脳に近接し、視髓と視小葉は長い視柄 (optic stalk) と呼ばれる神経で連結している (図2)。コオロギでは視葉板-視髓複合体 (LM複合体) を切除することで歩行活動リズムが消失する (図1) ことから、この部分に時計が在ることが示唆された<sup>3</sup>。こうなると次に取り組むべきは、視葉に時計が在ることを証明することであった。当時既に、InouyeとKawamura<sup>4</sup>により、埋め込み電極を用いた神経活動の長時間記録法により、ラットのSCNが時計組織であることが示されていた。しかし、視葉の神経活動を長時間記録することはそれほど簡単ではなかったので、網膜電図 (ERG) を指標にして、視葉の外側にある複眼の感度リズムを調べることにした。ERGの振幅は主観的夜に増大し、昼低下するリズムを示すが、このリズムは視柄を切断してLM複合体を脳から隔離しても継続することが分かった (図3)<sup>5,6</sup>。

こういった実験を続けているうちに、神経活動を長時間にわたって記録するための準備を整えることができたので、いよいよ視葉から電気活動を記録する実験に着手した。まず、視柄を切断して吸引電極を設置

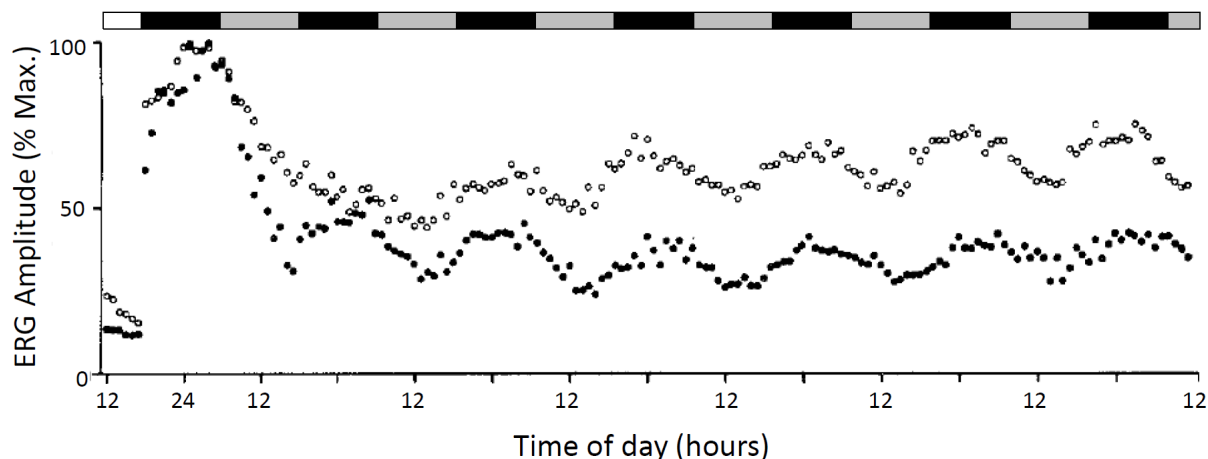


図3 ココロギ複眼の網膜電図 (ERG) 振幅の概日リズム。  
記録開始日の 18 時から恒暗、25°Cの下に置かれている。黒丸は正常側の、白丸は視柄切断側の複眼から記録された ERG リズムを示す。記録上部の白、グレー、黒色のバーは明期(白)および恒暗移行前の明期(グレー)、暗期(黒)を示す。ERG の振幅は主観的夜に増大し、主観的昼に低下するが、このリズムは視柄切断後も継続する。Tomioka & Chiba<sup>5</sup>を改変。

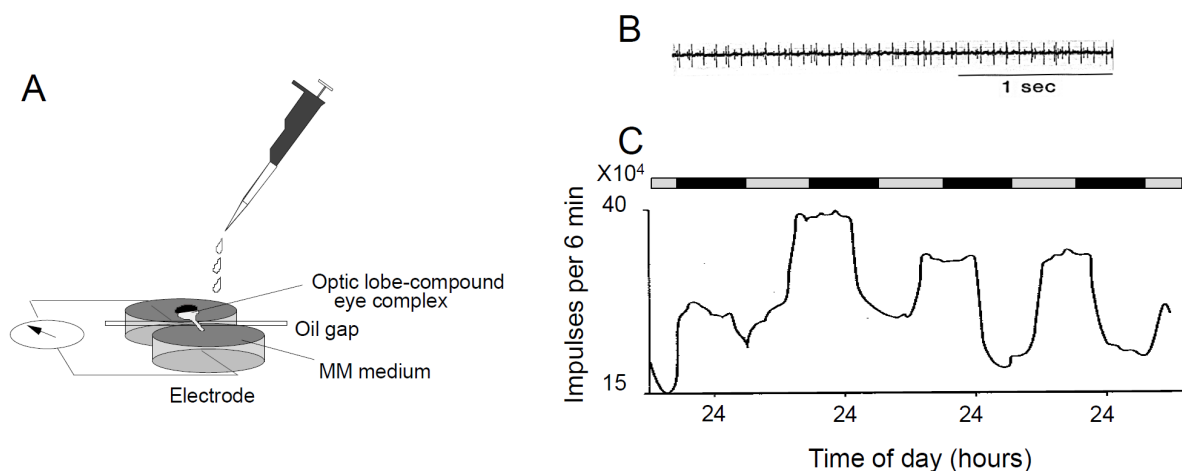


図4 視葉 - 複眼複合体の培養下での電気活動の概日リズム。  
(A) オイルギャップ法による視葉遠心性ニューロンの活動電位記録法。プラスチックプレートの2つのホールにMM培地を満たし、その間はオイルで絶縁した。片側の培地に視葉 - 複眼複合体を入れ、複合体から延びる視柄を反対側の培地にいれ、視葉から視柄を経て脳へ送られる電気活動を記録した。  
(B) 記録された活動電位の一例。  
(C) 視葉電気活動の長時間記録。6分間の活動電位の発射頻度は夜高く昼低い明瞭な概日リズムを示した。記録の上のグレーと黒のバーは、記録前に置かれていた明(グレー)暗(黒)周期を示す。温度は20°C。Tomioka & Chiba<sup>9</sup>を改変。

し、脳から隔離した LM 複合体から脳へ送られる神経活動を記録した。その結果、LM 複合体の電気活動は夜間に増加し、昼低下するリズムを示し、このリズムは恒暗、恒明条件下で継続することが分かり、LM 複合体に時計が在る可能性が強く示唆された<sup>7</sup>。最終的に LM 複合体に時計が在ることを証明するには、この複合体を体外培養し、リズムを検出する必要があった。この実験にはクリアすべき点が2つあった。一つは、培養系の確立で、もう一つは電気活動の記録法である。昆虫の神経系の培養には、気管が付着した状態で神経組織を切り出し、気管の断面を開口した状態で培地液

面上に浮かべねばならない。昆虫の神経系は気管を通して、直接ガス交換をしているためである。幸いにして、この手法は、米国でポストドクをしている時に、タバコスズメガの脳の体外培養実験<sup>8</sup>に従事することで修得することができた。電気活動の記録法についても、米国留学前に当時山口大学教養部におられた岡島昭教授から、オイルギャップ法をご教示いただいた。培地については、手に入るいろいろなものを試してみたが、なかなか良いものが見つからなかった。そのような折、本学会の前身の生物リズム研究会の年次大会で、獨協大学の渡辺和人先生から、Mitsuhashi と

Maramorsch の培地 (MM 培地) が使えるかも知れないと、教えていただいた。そこで、さっそくこの培地を使ってみたところ、非常に良好で、1 週間程度培養下で電気活動を記録することができるようになった。その結果、視葉の神経活動は培養下でも、主観的夜高く、昼低いリズムを示すことが明らかとなり、視葉に時計が在ることを実証することができた (図 4) 9。

### 3. 左右視葉時計の同調機構

さて、視葉は左右に一对あるが、歩行活動には通常一つのリズムしか現れない。これは左右の時計が同調して動くためであると考えられた。そこで、この背後にある相互同調機構を解析することにした。通常は同調して動く左右の時計を脱同調させるために、左右の時計を異なる周期で動かすことを試みた。すなわち片

側の視神経を切断して盲目にし、正常側は複眼を通じて明暗 13:13 を与えることで、26 時間周期で駆動した。左右の時計間に相互作用がないと想定すれば、盲目側は恒暗条件と同等の条件に置かれるので、24 時間よりやや短い周期で自由継続するはずである。実際には、正常側は明暗周期に同調して正確に 26 時間の周期で活動リズムを駆動したが、盲目側の駆動するリズムは正常側の活動リズムとの位相関係に依存した周期の変調を示した (図 5A) 10, 11。盲目側の周期は、正常側の活動が盲目側の主観的昼にあれば短縮し、主観的夜にあれば延長する (図 5B)。これらの結果から、正常個体では相互に位相を一致させるような相互作用が働いていることが示唆された (図 5C)。さらに、活動量は、活動開始が反対側の主観的夜にあれば増加し、主観的昼にあれば減少した (図 5A) 10, 11。従って、

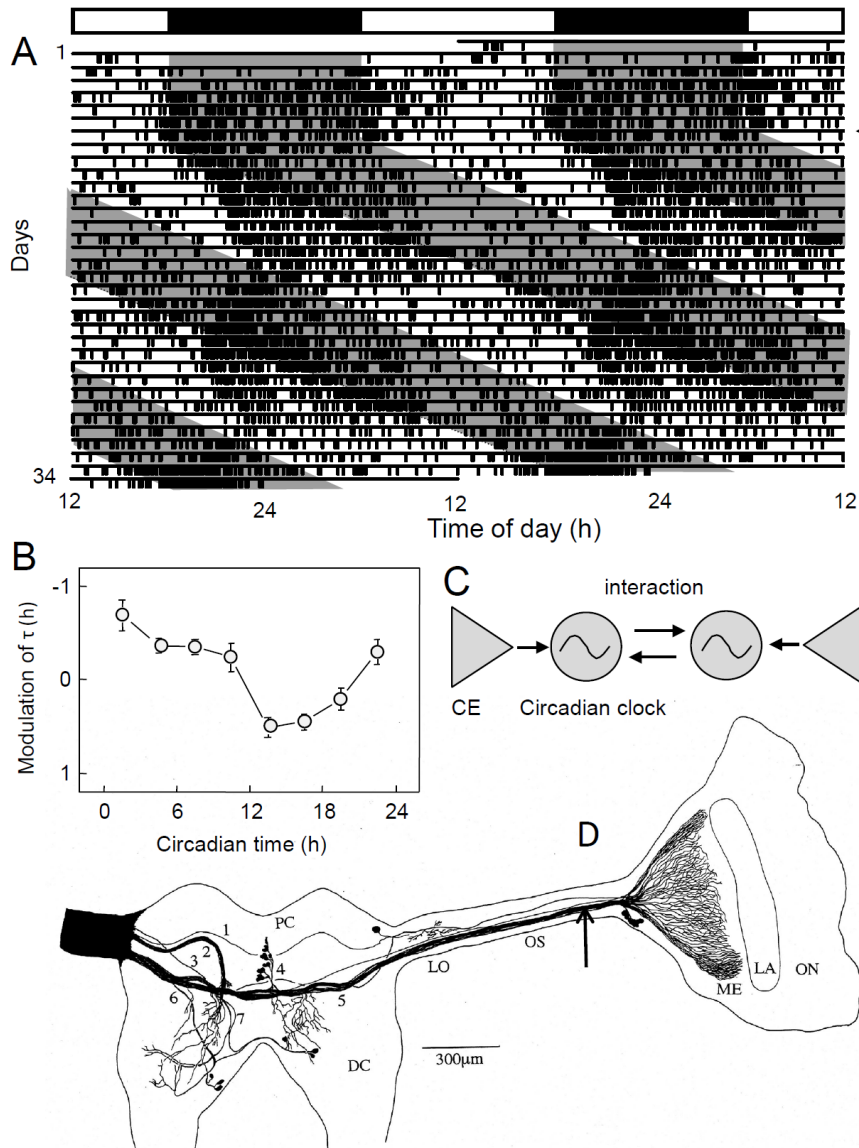


図 5 フタホシオロギにおける左右視葉概日時計間の相互作用。

(A)  $\Delta$ で示した日に片側視神経を切断し、正常側の複眼に明暗 13:13 を与えた場合の活動記録。温度は 25°C。グレーの影をつけた部分が暗期を示している。明暗周期に同調して 26 時間の周期を示す成分 (正常側) と、自由継続する成分 (盲目側) が同時に現れているが、自由継続成分の周期は同調成分との位相関係に応じて変化している。Yukizane & Tomioka<sup>13</sup> を改変。

(B) 自由継続成分の周期の変調。横軸は自由継続成分の概日時刻を、縦軸は自由継続成分の周期の平均からの偏差を示している。各点は同調成分の活動が開始する自由継続成分の概日時刻とその時生ずる自由継続成分の周期の平均からの変化を示す。自由継続成分の周期は、同調成分が自由継続成分の主観的夜にある場合には延長し、主観的昼にある場合には短縮する。Yukizane & Tomioka<sup>11</sup> を改変。

(C) 左右の相互作用の模式図。左右の視葉時計はそれぞれ同側の複眼から入力される光周期に同調するが、左右の時計は相互に同調する仕組みを備えている。

(D) 左右視葉時計間の相互作用に関与した神経路。左の視柄を切断し、そこから  $\text{NiCl}_2$  をバックフィルすることで染色された神経路をスケッチした。矢印は左右の視髄部分を直接連結するニューロン群の軸索で、この軸索路を切断すると、周期の変調は消失する。Tomioka et al.<sup>12</sup> を改変。

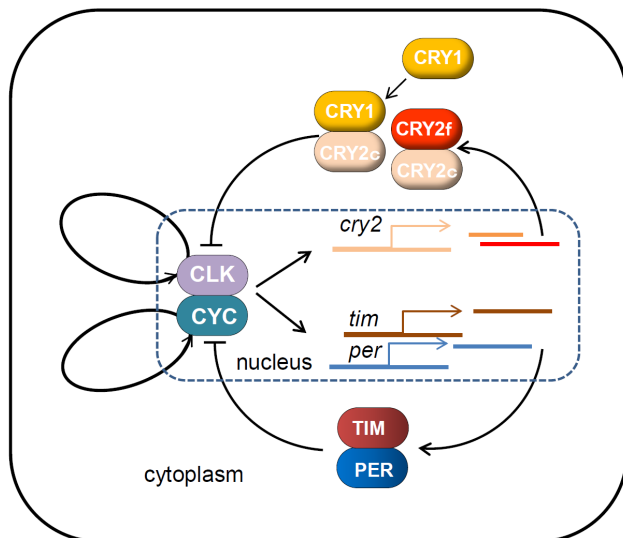


図6 コオロギ概日時計分子振動機構の仮説。

時計機構には *per/tim* ループに加えて、*cry2* の振動ループがある。いずれも転写の活性化は CLK/CYC により、産物タンパク質の負のフィードバックにより発振する。この他に、CYC も周期的に発現するが、これにはおそらく *E75* と *HR3* が関与している。また、CLK も条件によって周期的に発現するが、そこには *vri* と *Pdp1* が関与する可能性が高い。これらに加えて、*cwo* も振動機構に関与する可能性が示唆されている。Tokuoka et al.<sup>17</sup> を改変。

左右の時計は、相互に主観的昼には相手方の駆動する活動を抑制し、夜には増強することも明らかとなった。この相互同調と、活動量の制御により、正常個体では一貫した夜行性の活動リズムを現すことが示唆された。引き続き詳細な解析から、相互作用にかかわる神経路を特定し(図 5D)、さらにセロトニンがこの相互作用にかかわることも明らかにすることができた<sup>12-15</sup>。

#### 4. コオロギ概日時計の分子振動機構

2003 年に岡山大に赴任してからは、分子生物学的手法を導入し、時計の振動機構、光同調機構、さらには季節適応機構などの研究を進めてきた。対象もフタホシコオロギから、キイロショウジョウバエ、光周性の明確なタンボコオロギ (*Modicogryllus siamensis*)、原始的な無変態昆虫マダラシミ (*Thermobia domestica*) にまで広がってきた。山あり谷ありであったが、研究を進めることができたのは RNAi を早期に導入できた点にあったと思う。これには、徳島大学工学部の野地澄晴先生(現徳島大学長)に大変お世話になった。岡山大に赴任して間もないころ、野地先生から「コオロギでは発生に関与する遺伝子の RNAi が非常によく効くので、*per* の 2 本鎖 RNA のリズムへの効果を調べてみてはどうですか」とお誘いを頂いた。

早速、投与してみたところ、コオロギの活動リズムが完全に消失することが分かった<sup>16</sup>。これを契機として、様々な時計遺伝子をクローニングし、その 2 本鎖 RNA の効果を見るという逆遺伝学的手法で、時計の振動機構、光同調機構、光周測時機構などの解析を進めることができた。研究費の面では、外部資金に加えて岡山大学重点研究の支援が頂けたことが非常に有難いことであった。このお陰で割合早期に real-time PCR 装置を導入することができ、分子生物学的な研究を展開することができた。このように、岡山大学では神経行動学から分子生物学へと大きく方向転換し、昆虫に例えれば変態を経験したように思う。M2 の終わりころ、ある先生から「どうして脳をすりつぶさないの？」と分子生物学的手法の導入を進めて頂いた折、「先生、すりつぶして元の形を失くしたら、何も分かりませんよ。」などと言っていたことを思い出し、少々きまりが悪い思いをしている。

これまでに明らかになったコオロギ概日時計の分子振動機構は、*per/tim* の負の転写 - 翻訳フィードバックループと *cry2* のフィードバックループを含んでいる(図 6)<sup>16-18</sup>。いずれのループも CLK/CYC が転写活性化因子として働き、*per/tim* および *cry2* の転写を活性化する。*per/tim* ループでは、証明はできていないが、RNAi の状況証拠から、産物タンパク PER/TIM が複合体を形成して CLK/CYC の転写活性を抑制すると考えている。一方、*cry2* は同じく CLK/CYC により転写が活性化されるが、mRNA には 7 種のスプライシングバリエントがあり、そのうち数種の産物タンパクがバリエント間または CRY1 と複合体を形成して CLK/CYC の活性を抑制する<sup>17</sup>。興味深いことに、*tim* の RNAi では活動リズムが継続し<sup>19</sup>、その場合にはほとんどの時計遺伝子の発現リズムが消失するが *cry2* は発現リズムを維持する。一方、*cry1/cry2* の RNAi でもやはり活動リズムが継続し、この場合には *tim* が周期的に発現する<sup>17</sup>。これらの事実から、*per/tim* ループと *cry2* ループは独立に振動すると考えている。

コオロギの振動機構にはこれらに加えて、*cyc* の日周発現と *cwo* の日周発現のループがあることが示唆されている<sup>20-21</sup>。さらに、*cyc* の RNAi により *Clk* が日周発現を示すことから、*Clk* も潜在的に周期発現する仕組みを備えているらしい<sup>21</sup>。

#### 5. 視葉外時計

上述のようにコオロギでは LM 複合体を切除すると歩行活動リズムが消失するが、個体によっては切除

後数日間弱いリズムを維持する場合がある<sup>22</sup>。また、LM 複合体の切除後視神経と視柄との神経連絡が再生した場合に、しばしば光に同調した歩行活動リズムが現れ、それが恒暗条件下でもしばらく継続する<sup>23</sup>。従って、視葉外に弱いながら活動リズムを制御する時計が在ると考えられる。Rence と Loher<sup>24</sup>も別種のコオロギ *Teleogryllus commodus* で誘引歌の発音行動リズムを制御する時計が視葉外にもある可能性を示唆している。雄コオロギは夜間に活発に発音を行う明瞭な概日リズムを示す。彼らは、視葉を切除されたコオロギで、恒明条件下で無周期になっていた発音行動が、24 時間の温度周期を与えるとリズムを示すようになり、このリズムが数日間の移行期を伴って正常個体と同様の位相で温度周期に同調することなどを報告している。

視葉外時計と視葉時計との関係を探るため、脳、最終腹部神経節と前胃、中腸などの末梢器官について時計遺伝子の発現を検討した。その結果、恒暗条件下で *per*、*tim* が周期的に発現することから、これらの神経組織や末梢器官にも概日リズムが在ることが示さ

れた<sup>25</sup>。LM 複合体を切除すると、前胃では *per* と *tim* の両方のリズムが失われ、中腸と最終腹部神経節では *tim* の発現が不規則になったが、*per* の発現は維持された。脳では、*per* と *tim* の両方の mRNA のリズムが維持されたが、正常個体と比較して位相のずれが観察された。これらの結果から、中腸、最終腹部神経節、脳には概日時計が在り、これらの視葉外時計は視葉からの制御を受けているが、その程度が組織により異なることが示唆された<sup>25</sup>。ショウジョウバエでは、からだのほとんどの組織に時計が在り、それらの多くは個別に光に同調し独立のリズムを刻むと考えられている<sup>26, 27</sup>が、コオロギでは視葉外時計の中核依存度がハエよりも高いようである。末梢時計の中核依存度は、活動期に光を受ける昼行性動物では末梢時計が個別に光に同調するため低く、活動期に光が乏しい夜行性動物では高いとする考えがある<sup>28</sup>が、コオロギの場合にはこの説は当てはまらない。前述のようにコオロギは幼虫期には昼行性を示すが、幼虫期の視葉外時計の中核依存性を検討したところ、成虫よりもむしろ中核依存度が高いという結果が得られている<sup>29</sup>。

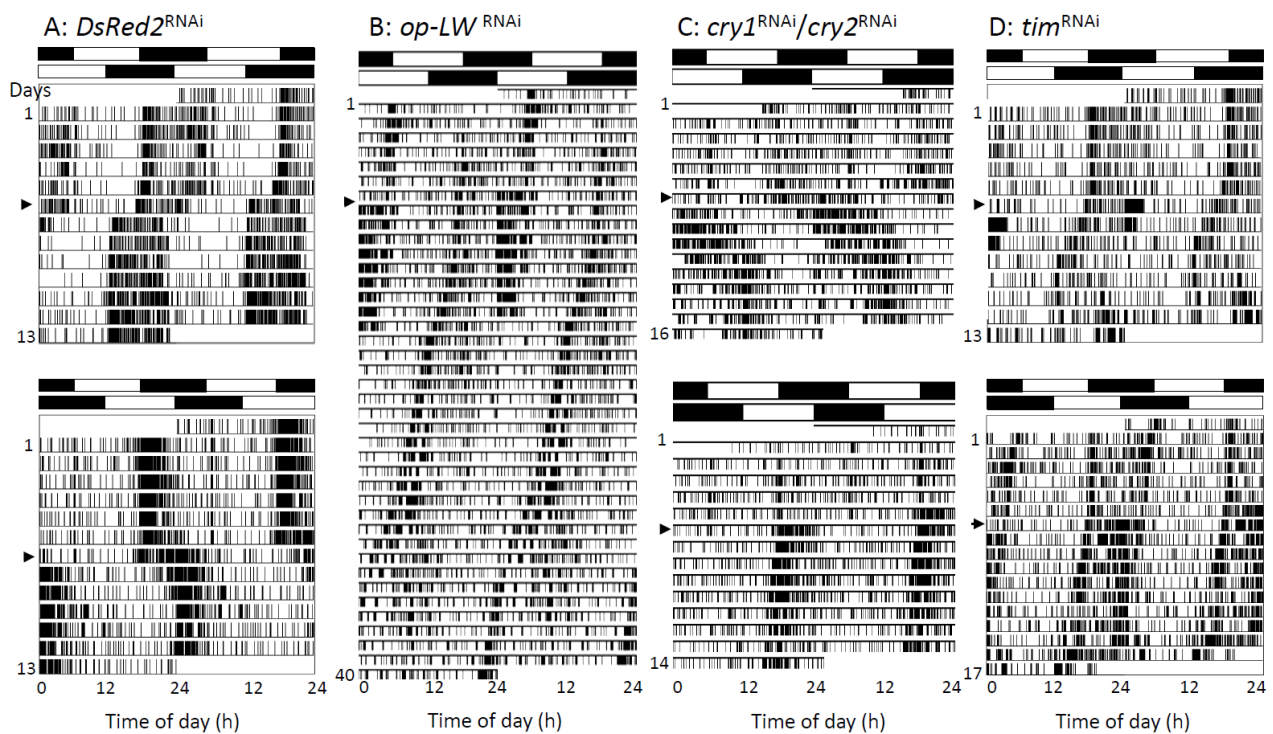


図7 歩行活動リズムの光周期への再同調過程を対象とした、光同調に関与する遺伝子の RNAi による機能解析。  
 (A) サング由来の遺伝子 *DsRed2* の 2 本鎖を投与されたコントロール個体の 6 時間位相前進 (上) と後退 (下) 後の明暗周期への再同調。いずれも数サイクルの移行期を経て再同調している。  
 (B) 複眼で発現する緑色光受容分子遺伝子 *op-LW* の RNAi 処理個体の活動リズム。わずかな relative coordination がみられるが、光周期には同調できない。Komada et al.<sup>32</sup> を改変。  
 (C) *cry1* と *cry2* の 2 重 RNAi 処理個体の活動リズム。位相前進、後退とも再同調が異常となる。Kutaragi et al.<sup>35</sup> より。  
 (D) *tim*<sup>RNAi</sup> 処理個体の活動リズム。光周期の位相前進時には同調するが(上)、位相後退時には応答できない(下)。アクトグラム上部の白黒のバーは明(白)暗(黒)周期を示す。アクトグラム左の黒三角は明暗周期を位相変位させた日を示す。

## 6. コオロギ概日時計の光同調機構

### 6.1 光受容器

環境サイクルへの同調は、概日時計が活動を始めとする様々な生理機能の位相を設定するための重要な機能である。時計を同調させる環境因子は、光、温度などがあるが、光が最も重要な因子である。昆虫の光同調機構はキイロショウジョウバエで最も詳しく解析されている。ハエでは脳内の時計細胞のいくつかで発現するCRYが光受容分子として機能している<sup>30</sup>。CRYは光依存的にTIMに作用し分解に導く。これによって夜の前半では位相後退が、夜の後半では位相前進が惹き起こされ、光同調に導かれる<sup>31</sup>。コオロギでは複眼網膜から視葉に伸びる視神経を切断すると活動リズムが明暗周期下でも恒暗条件下のように自由継続を始める。コオロギには3個の単眼がある(図1)が、これらは無傷で残されていても、同調はできない<sup>3</sup>。従って、複眼が唯一の光同調のための光受容器である。コオロギ複眼内には紫外光、青色光、緑色光をそれぞれ受容する、opsin-UV、opsin-Blue、opsin-LWの3種の光受容分子が発現している<sup>32</sup>。これらは複眼内で特徴的な発現パターンを示し、opsin-UVは腹側部の一部を除き全域で、個眼あたりおそらく1個の視細胞で発現しており、opsin-Blueは背縁部の大部分の視細胞と腹側部でopsin-UVと置き換わって発現している。Opsin-LWは背縁部を除く領域でopsin-UV、opsin-Blue発現細胞を除く細胞で発現する。3種の光受容分子の機能をRNAiにより解析したところ、opsin-UVとopsin-BlueのRNAiは光同調にほとんど影響しないが、opsin-LWの発現抑制で活動リズムの光同調が強く阻害されることが分かった(図7B)<sup>32</sup>。この結果は、複眼の部分切除を行った場合、切除

領域が大きくなると位相変位後の明暗サイクルへの再同調に必要な日数が増加するが、同調そのものは妨げられない<sup>33</sup>、という結果と合致する。

### 6.2 光同調の分子機構

複眼からの光情報は、視神経を経て時計部位である視葉に伝達される。われわれはこれまでに、視葉時計細胞での光同調機構が2つの経路からなることを明らかにした(図8)。一つは*Pdp1*の関わる経路(*Pdp1*系)であり<sup>34</sup>、もう一つは*cry1*、*cry2*の関わる系路(*cry2*系)である<sup>35</sup>。*Pdp1*系は明期が延長した場合にのみ働く。明期を3時間延長したのち恒暗に置いた場合、活動リズムは位相後退する。この後退量は、一度暗黒に置いたのち主観的夜の初め(CT12-15)に3時間の光照射を行なった場合より、わずかにではあるが有意に大きい<sup>34</sup>。明期を3時間延長した時の時計遺伝子のmRNAをqPCRで測定したところ、照射後1時間で*Pdp1*の発現量が増加し、それに続いて、*Clk*、*per*、*tim*の発現量が増加することが分かった。すなわち、*per*、*tim*の増加により主観的夜が遅延してリズムの位相後退が生ずると考えられた。ところが、CT12-15に光照射を行なった場合や、夜の後半(ZT20-23)に光照射を行なった場合には、時計遺伝子の発現量に変化は見られなかった<sup>34</sup>。一度暗期を挟むと、*Pdp1*系は光誘導がかからないようである。

ここで、暗黒下での光照射による、主観的夜前半の位相後退や主観的夜後半の位相前進はどのような仕組みで生ずるのかが問題となる。これまでの結果から、この系には*cry1*、*cry2*が関与することが明らかとなった<sup>35</sup>。*cry1*、*cry2*の単独のRNAiでは光同調は全く阻害されないが、*cry1/cry2*の2重RNAiでは、多

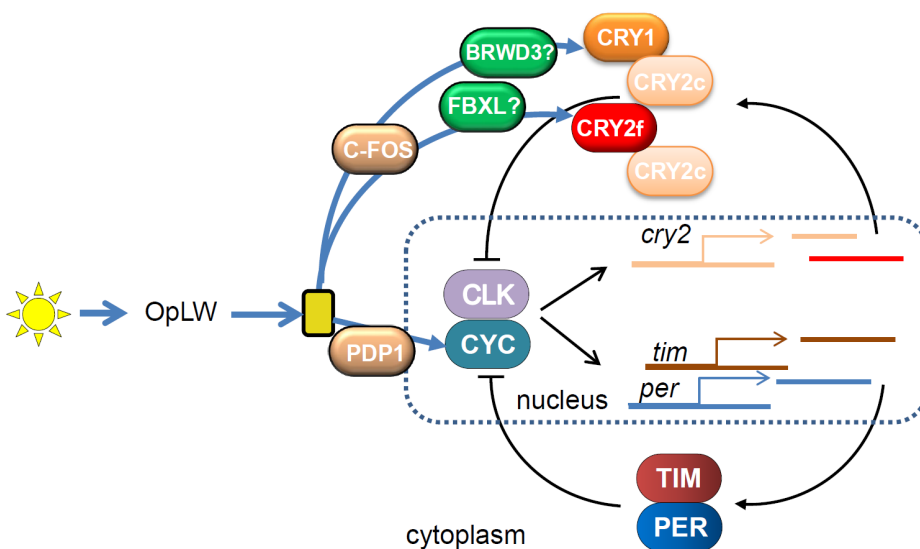


図8 コオロギ概日時計の光同調の分子機構。

明期を延長した場合の位相後退時には、*Pdp1*が発現し、それによって*Clk*の発現が亢進し、さらに*tim*が発現亢進する。それによって主観的夜が遅延し、位相後退が生ずる。一度暗期を挟んだ場合には、主観的夜後半、夜の前半のいずれでも*c-fos*の発現が生じ、その後CRY1/CRY2が関わる系によって位相前進、後退が生ずる。これまでのところ、CRYの上流に*Brwd3*や*Fbxl*が関与する可能性を示す結果が得られている。また、主観的夜前半の光による位相後退には*tim*が必要である。Kutaragi et al.<sup>35</sup>を改変。

くの個体で位相変位後の明暗周期への再同調が阻害される(図7C)。2重RNAi処理個体では、CT12-15での光照射、およびZT20-23での光照射による位相変位が強く阻害されることも分かった。*cry1*、*cry2*のmRNAレベルはこれらの光照射時には変化しないが、CRY2タンパク質は夜間の光照射により減少する。従って、複眼からの光情報がCRY2タンパク質の変化を誘導することとなるが、われわれはこの系に*c-fos*が関与することを明らかにしている(図8)<sup>35</sup>。CT12-15あるいはZT20-23での光照射により、*c-fos*発現量は有意に上昇する。*cry1*、*cry2*のRNAiは*c-fos*の光誘導に影響しないこと、*c-fos*のRNAiでは位相変位が強く抑制されること、さらに*opsin-LW*のRNAiで*c-fos*の光誘導が抑制されることから、時計細胞では*opsin-LW*発現細胞からの情報が*c-fos*を誘導し、それが何らかの経路を経てCRY2の分解を誘導すると考えられる。In situ hybridizationとin situ PCRにより、*per*、*cry2*を発現する時計候補細胞で*c-fos*も発現することが確かめられている<sup>35</sup>。現在、*c-fos*がCRY2の光分解を誘導する系の解析を進めている。これまでのところ、この系には*Brwd3*、*Fbxl*などが関与することを示唆する結果を得ている。

興味深いことに、主観的夜前半での光によるこの*c-fos/cry*系を介する位相後退には、*tim*が関与することが明らかになってきた。*tim*<sup>RNAi</sup>処理個体は、明暗周期の位相前進には同調するが、しばしば位相後退には応答できなくなる(図7D)。さらに、それらの個体は恒明条件にも応答できない。このコオロギの活動リズムは、恒明条件下では通常24時間よりもかなり長い周期で自由継続するが、*tim*<sup>RNAi</sup>処理個体では周期が逆に24時間よりも短くなる。この結果は、*tim*が時計の位相後退に重要な役割を担っており、*tim*の発現抑制により主観的夜前半の位相後退が欠損し、主観的夜後半の位相前進だけが生ずるために、周期の短縮が生じたと解釈できる。

## 6. 終わりに

コオロギの時計機構を中心に書いてきたが、少し他の昆虫との関連を見ておきたい。ハエ以外で昆虫の時計機構の研究を牽引してきたのは、ゴキブリである。その多くはPittendrighとその共同研究者の業績である。時計の所在や時計による行動制御については、Pittendrighの弟子にあたるTerry Pageが優れた成果を上げている。彼は視葉の移植により、視葉が時計の座であることを明らかにした<sup>36</sup>。その際、LD11:11とLD13:13の下で発育させ、周期が正常個体よりも

短い、あるいは長い個体を作成し、その間で交換移植を行って、移植後はdonorの周期が発現することを示した<sup>37</sup>。さらに片側のみ移植すると、正常側からの強い抑制により移植側に駆動される活動が現れないが、正常側の視神経幹を切断することで移植側に駆動される活動リズムが現れるようになることなどを見出している<sup>37</sup>。これらの結果は、視葉が時計の座である点、視葉間に相互活動抑制機構がある点などが、コオロギとゴキブリとに共通することを示している。一方、ゴキブリでは視小葉の腹側ないしは視髄腹側前方部にある副視髄に時計が在ることが想定されているが<sup>38,39</sup>、コオロギでは視葉板と視髄の間にある外キアズマ付近に時計細胞があることが示唆されており、細かい点では違いがある。

ハエでは、脳の側方視葉寄りの部分と脳背側部に時計細胞があることが示されている<sup>40</sup>。これらのうち特に、脳側方部の小型の細胞(sLN<sub>v</sub>)が活動リズムの制御に関与することが示唆されている<sup>41</sup>。時計細胞の位置はずいぶんコオロギとは異なっているが、脳の構造が両者で異なっており、発生過程を追ってその起源をたどれば、両者の関係が見えてくるかもしれない。

一方、分子振動機構や光同調機構に関しては、類似の点もあるが、両者で大きく異なる点もある。例えば、ハエでは脳時計細胞の光受容分子として働くCRY<sup>30</sup>が、コオロギでは分子振動機構の中で*per/tim*とは独立に負のフィードバックループを形成している点で異なる<sup>17</sup>。さらに、光同調機構もハエではCRYの光受容によりTIMが分解されることでリセットが生ずるが、コオロギでは完全に複眼に依存しており、CRYは*c-fos*の下流で働くこと<sup>35</sup>、明期が延長されたときには*Pdp1*が働くことなどの点で異なっている<sup>34</sup>。同じ昆虫類なのに、なぜこのような違いがあるのかだろうか、このような違いは何に起因するのだろうか、などと、様々な疑問が湧いてくるが、これらについては今後の研究にゆだねたい。

## 7. 謝辞

概日時計の研究への手ほどきをしていただいた千葉喜彦先生(山口大学名誉教授)に深くお礼申し上げます。また、山口大学、岡山大学で研究を共にした学生諸氏・博士研究員諸氏にも深くお礼申し上げます。彼らの協力無くしては、研究を進めることは到底できなかったと思う。分子生物学的研究の開始にあたって様々な助けていただいた、松本顕氏(順天堂大学)、野地澄晴氏(現徳島大学長)には特に厚くお礼を申し上げます。さらに、一人一人のお名前を上げることはでき



ないが、有形無形のご支援を頂いた多くの方々に深くお礼を申し上げます。本研究の一部は科学研究費補助金によって行われた。執筆の機会を与えていただいた吉川先生をはじめ、編集委員の先生方に感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Tomioka, K. & Chiba, Y. Post-embryonic development of circadian rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* **147**, 299-304 (1982).
2. Nishiitsutsuji-Uwo, J. & Pittendrigh, C. S. Central nervous system control of circadian rhythmicity in cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillation? *Z. vergl. Physiol.* **58**, 14-46 (1968).
3. Tomioka, K. & Chiba, Y. Effects of nymphal stage optic nerve severance or optic lobe removal on the circadian locomotor rhythm of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci.* **1**, 375-382 (1984).
4. Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 5962-5966 (1979).
5. Tomioka, K. & Chiba, Y. Persistence of circadian ERG rhythms in the cricket with optic tract severed. *Naturwissenschaften* **69**, 355-356 (1982).
6. Tomioka, K. Optic lobe-compound eye system in cricket: a complete circadian system. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* **16**, 73-76 (1985).
7. Tomioka, K. & Chiba, Y. Circadian rhythms in the neurally isolated lamina-medulla complex of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **32**, 747-755 (1986).
8. Tomioka, K. & Bollenbacher, W. E. Neurophysiological events during the head critical period for prothoracicotropic hormone release in fourth-instar larvae of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **35**, 1023-1030 (1989).
9. Tomioka, K. & Chiba, Y. Characterization of an optic lobe circadian pacemaker by in situ and in vitro recording of neuronal activity in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* **171**, 1-7 (1992).
10. Tomioka, K., Yamada, K., Yokoyama, S. & Chiba, Y. Mutual interactions between optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* **169**, 291-298 (1991).
11. Yukizane, M. & Tomioka, K. Neural pathways involved in mutual interactions between optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* **176**, 601-610 (1995).
12. Tomioka, K., Nakamichi, M. & Yukizane, M. Optic lobe circadian pacemaker sends its information to the contralateral optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A* **175**, 381-388 (1994).
13. Tomioka, K. & Yukizane, M. A specific area of the compound eye in the cricket *Gryllus bimaculatus* sends photic information to the circadian pacemaker in the contralateral optic lobe. *J. Comp. Physiol. A* **180**, 63-70 (1997).
14. Tomioka, K. Light and serotonin phase-shift the circadian clock in the cricket optic lobe in vitro. *J. Comp. Physiol. A* **185**, 437-444 (1999).
15. Saifullah, A. S. M. & Tomioka, K. Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* **205**, 1305-1314 (2002).
16. Moriyama, Y. *et al.* RNA interference of the clock gene *period* disrupts circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Rhythms* **23**, 308-318 (2008).
17. Tokuoka, A. *et al.* *cryptochrome* genes form an oscillatory loop independent of the *per/tim* loop in the circadian clockwork of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Lett.* **3**, 5 (2017).
18. Tomioka, K. & Matsumoto, A. Chapter Three - The circadian system in insects: Cellular, molecular, and functional organization. *Adv. Insect Physiol.* **56**, 73-115 (2019).
19. Danbara, Y., Sakamoto, T., Uryu, O. & Tomioka, K. RNA interference of *timeless* gene does not disrupt circadian locomotor rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **56**, 1738-1745 (2010).

20. Tomiyama, Y. *et al.* The role of clockwork orange in the circadian clock of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Lett.* **6**, 12 (2020).
21. Uryu, O., Karpova, S. G. & Tomioka, K. The clock gene *cycle* plays an important role in the circadian clock of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **59**, 697-704 (2013).
22. Tomioka, K. Residual circadian rhythmicity after bilateral lamina-medulla removal or optic stalk transection in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **31**, 653-657 (1985).
23. Tomioka, K. & Chiba, Y. Photoperiodic entrainment of locomotor activity in crickets (*Gryllus bimaculatus*) lacking the optic lobe pacemaker. *J. Insect Physiol.* **35**, 827-835 (1989).
24. Rence, B. G. & Loher, W. Arrhythmically singing crickets: thermoperiodic reentrainment after bilobectomy. *Science* **190**, 385-387 (1975).
25. Uryu, O. & Tomioka, K. Circadian oscillations outside the optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **56**, 1284-1290 (2010).
26. Plautz, J. D., Kaneko, M., Hall, J. C. & Kay, S. A. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* **278**, 1632-1635 (1997).
27. Giebultowicz, J. W., Stanewsky, R., Hall, J. C. & Hege, D. M. Transplanted *Drosophila* excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. *Curr. Biol.* **10**, 107-110 (2000).
28. 山崎晋. in 時間生物学 (eds 海老原史樹史 & 吉村崇) 80-90 ( (株) 化学同人, 2012).
29. Uryu, O. & Tomioka, K. Post-embryonic development of the circadian oscillations within and outside the optic lobe in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci.* **31**, 237-243 (2014).
30. Stanewsky, R. *et al.* The *cry<sup>b</sup>* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* **95**, 681-692 (1998).
31. Myers, M. P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A. & Young, M. W. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* **271**, 1736-1740 (1996).
32. Komada, S. *et al.* Green-sensitive opsin is the photoreceptor for photic entrainment of an insect circadian clock. *Zool. Lett.* **1**, 11 (2015).
33. Tomioka, K., Okada, Y. & Chiba, Y. Distribution of circadian photoreceptors in the compound eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Rhythms* **5**, 131-139 (1990).
34. Kutaragi, Y., Miki, T., Bando, T. & Tomioka, K. Transcriptional and non-transcriptional events are involved in photic entrainment of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Physiol. Entomol.* **41**, 358-368 (2016).
35. Kutaragi, Y. *et al.* A novel photic entrainment mechanism for the circadian clock in an insect: involvement of *c-fos* and *cryptochromes*. *Zool. Lett.* **4**, 26 (2018).
36. Page, T. L. Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. *Science* **216**, 73-75 (1982).
37. Page, T. L. Effects of optic tract regeneration on internal coupling in the circadian system of the cockroach. *J. Comp. Physiol. A* **153**, 231-240 (1983).
38. Page, T. L. Interaction between bilaterally paired components of the cockroach circadian system. *J. Comp. Physiol.* **124**, 225-236 (1978).
39. Reischig, T. & Stengl, M. Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *J. Exp. Biol.* **206**, 1877-1886 (2003).
40. Helfrich-Förster, C. The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.* **62**, 94-102 (2003).
41. Grima, B., Chelot, E., Xia, R. & Rouyer, F. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* **431**, 869-873 (2004).