

キイロショウジョウバエ概日時計の温度サイクル同調機構

吉井大志¹・富岡憲治²

¹University of Regensburg, Institute of Zoology

²岡山大学大学院自然科学研究科

地球の自転によってもたらされる約24時間の温度サイクルは、光サイクルと共に概日時計にとって重要な同調因子である。しかし、概日時計がどのような機構によって温度サイクルに同調するのかは大部分未解明である。キイロショウジョウバエを用いた概日時計の研究はここ数十年のうちに急激な進歩をとげ、数個の時計遺伝子で構成される自己調節フィードバックループが振動の中心機構であることが明らかにされている。現在、われわれを含むいくつかの研究グループがキイロショウジョウバエを用いて、概日時計と温度との関係を研究しており、少しずつ温度サイクル同調機構が明らかにされつつある。キイロショウジョウバエの歩行活動リズムは恒明条件、温度一定下では無周期になるが、温度サイクル下ではその温度サイクルに同調したリズムを示す。時計突然変異系統では活動リズムの温度同調性が異常になること、時計タンパク質、時計遺伝子の周期的発現が温度サイクルに同調することから、温度同調機構の背後には自己調節フィードバックループが関与することが明らかにされた。また概日時計の温度入力系の研究も進められており、*norpA* と *nocte* の2つの遺伝子が温度入力系に関わる遺伝子であることが最近同定された。

1. はじめに

1971年にKonopkaとBenzerはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて、歩行活動リズムと羽化リズムが恒暗条件下で無周期、短周期、長周期のリズムになる突然変異体を3系統分離することに成功した¹⁾。それぞれの変異はX染色体の同じ遺伝子座に生じていたことから、その遺伝子を *period* (*per*) と命名し、それぞれの突然変異体を *period⁰* (*per⁰*)、*period^{short}* (*per^S*)、*period^{long}* (*per^L*) と命名した。この発見が概日時計機構を遺伝子レベルで明らかにしようとする研究の始まりと言える。1990年にはHardinらが *per* 遺伝子のmRNAが周期的に変動していることを発見し、概日リズムの背後にはフィードバックループ機構が関与していることを提案した⁷⁾。この後、次々と概日時計に関わる遺伝子が発見され、フィードバックループの構成因子(時計遺伝子)が徐々に明らかにされた。現在では相互に連結した2つのフィードバックループが存在することが提案されている(図1)⁸⁾。

フィードバックループの構成因子である *dClock*

(*dClk*)、*cycle* (*cyc*) の転写産物 dCLOCK (dCLK)、CYCLE (CYC) は2量体を形成し、*per*、*timeless* (*tim*) の転写を活性化させる。*per*、*tim* のmRNA量は夕方にピークに達し、翻訳されたタンパク質の発現量は夜の後半にピークに達する。*per*、*tim* の産物タンパク質 PERIOD (PER)、TIMELESS (TIM) は2量体を形成し、夜の後半に核内に移行し、dCLK-CYCの転写活性を抑制することで自身の転写を抑制する。この負のフィードバックが約24時間の

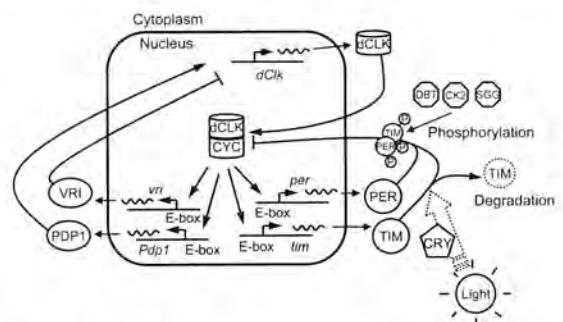


図1 キイロショウジョウバエ概日時計の分子モデル。詳細は本文を参照。

✉ x100dc@netscape.net (Universitaetsstrasse 31, 93053 Regensburg, Germany)

周期で循環することで、時計タンパク質PER、TIMの発現量が概日振動する。最近、このdCLK-CYCとPER-TIMにより構成される負のフィードバックループに加えて、VRILLE (VRI)、PDP1が関与する2つ目のループが発見された²¹⁾。dCLK-CYCはper、timとほぼ同じ位相でvri、Pdp1の転写を活性化し、それぞれのタンパク質の発現は夕方にピークを持つ日周変動を示す。VRIはdClkの転写抑制因子であり、PDP1はdClkの転写活性化因子である。これらの転写因子によって、dClkが周期的に転写制御を受けている。PER-TIMのループとVRI、PDP1のループが互いに連結し、相互作用することによって、より安定な約24時間周期のフィードバックを生み出していると考えられる。

光は概日時計にとって最も重要な同調因子である。他の生物でもそうであるが、キイロショウジョウバエでも概日時計の光同調機構は、分子レベル、組織レベルでよく研究されている。最も強力な光同調経路は、脳内の青色光受容分子CRYPTOCHROME (CRY) を介した経路であると現在のところ考えられている⁶⁾。CRYは時計細胞内で光を受容するとTIMに結合し、TIMを分解に導く¹¹⁾。このTIMの分解によってPER-TIM 2量体が減少し、フィードバックループがリセットされる。これが現在提案されているフィードバックループの光同調メカニズムの概要である。ショウジョウバエでは、薄いクチクラを通して光が脳内に直接届くことから、複眼などのような外部光受容器よりも、時計細胞内で直接光を受容する経路が発達したのかもしれない。しかし、光入力経路はCRYだけではなく、外部光受容器である複眼、単眼、H-B (Hofbauer-Buchner's) eyeletも時計の光受容器として働いていることが明らかにされている¹⁹⁾。しかし、これら外部光受容器からの光情報が、どの時計タンパク質に作用して時計をリセットするのかはまだ未解明である。

温度も光と同様に、時計に影響を与える同調因子として知られている。一般に、同調の速さは温度サイクルの振幅に依存することや、温度パルス、温度ステップでも位相依存的な位相反応が生ずることが知られているが、概日時計の温度同調の分子機構に関する研究はほとんど進んでいない¹⁸⁾。本稿では、キイロショウジョウバエ概日時計の温度サイクルへの同調機構について現在報告されている研究を概説する。

2. 温度同調性

温度サイクルへの同調は、1968年にZimmermanらがウスグロショウジョウバエの羽化リズムで報告している³²⁾。しかし、キイロショウジョウバエでは、ようやく1993年にWheelerらにより、歩行活動リズムに温度同調性が見られることが報告されている²⁷⁾。Wheelerらは恒暗条件下で振幅1℃の25℃/26℃、振幅1.5℃の25℃/26.5℃、振幅3℃の25℃/28℃の温度サイクルをキイロショウジョウバエに与え、その歩行活動リズムを計測した。振幅1℃の温度サイクルではほとんど同調が見られなかったが、1.5℃、3℃と温度サイクルの振幅が大きくなるに従って同調する個体の割合が増えた。さらに、同調した個体の活動パターンを解析すると、温度低下開始時刻よりも2.5時間前から活動が増加することが明らかになった。これは、ハエが温度低下開始時刻を予知していることを示しており、温度変化に対する直接反応によって起こる活動変化ではなく、概日時計の温度サイクルへの同調であることが示唆された。

歩行活動リズム以外に匂い物質に対する触覚の感度リズムも温度サイクルに同調することが知られている。匂い物質に対する触覚電図 (electroantennogram; EAG) の振幅は、明暗サイクル下で昼低く夜高いリズムを示す¹³⁾。Krishnanらは恒暗条件下で27℃ 12時間: 18℃ 12時間の温度サイクルを与えて、EAGを計測したところ、EAGリズムは温度サイクルに同調し、その振幅は高温期に高く、低温期に低くなった¹⁴⁾。このリズムは、温度一定下に移行した場合にもその位相を保ったまま自由継続する。このことから、EAGの振幅が温度により直接影響を受けるのではなく、EAGリズムを駆動する時計が温度サイクルに同調していることは明らかである¹⁴⁾。高温期は昼に、低温期は夜に対応するので、高温期に感度が上昇するというこの結果は、明暗サイクル下でのEAGリズムと矛盾しているように思われるが、この理由は今のところ説明できていない。

キイロショウジョウバエは恒明条件下では歩行活動が無周期になることが知られている (図2A)¹²⁾。これには、複数ある時計間の脱同調によってリズムが消失しているという解釈と、恒明によって時計が停止しているという解釈がある。恒明、温度一定の条件下では、脳のどの時計神経細胞においてもPERタンパク質の周期的変動が観察されないことから、われわれは時計が停止しているという後者の説が正

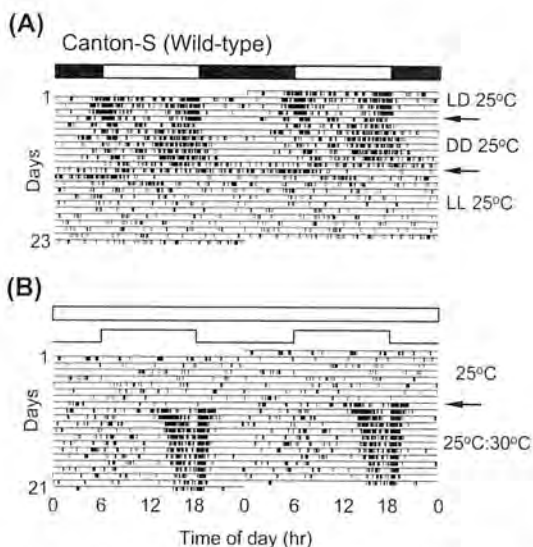


図2 キイロショウジョウバエ野生型 (Canton-S) の歩行活動を示したアクトグラム。(A) 明暗サイクル25°C一定の下で5日間歩行活動を記録した後、恒暗条件に移行し、さらにその後恒明条件に移行した。明暗サイクル下、恒暗条件下では明瞭なリズムが見られるが、恒明条件下では無周期になっている。(B) 恒明25°C一定の下で歩行活動を記録した後、温度サイクル(30°C:25°C 12hr:12hr)に移行した。25°C一定下ではリズムが観察されないが、温度サイクルに移行すると温度サイクルに同調したリズムが現れる。

しいのではないかと考えている。われわれのグループは1998年に、恒明条件下でもハエの歩行活動が温度サイクルに同調したリズムを示すことを報告した(図2B)²⁵⁾。この活動リズムも温度変化への直接反応ではなく、内因性の時計の温度サイクルへの同調によるリズムであることが以下の特徴により確認されている。1) 恒暗条件下の場合と同様に、温度低下開始時刻よりも前に活動が高まるという予知的活動を示す²⁵⁾。2) その予知的活動のピークは*per^S*突然変異系統では位相前進する²⁵⁾。3) 様々な周期の温度サイクル(T=32hr~8hr)を与えた場合に、活動ピークの位相が周期の長さに依存して変化する²⁶⁾。4) 恒明条件温度一定から温度サイクルに移行した場合、完全な同調までには数サイクルの移行期が必要である³⁰⁾。5) 温度サイクルの位相を数時間シフトした場合、再同調には数サイクルの移行期が必要である¹⁾。これらの事実から、恒明条件下でも温度サイクルによって時計が駆動すると考えられる。上述のように恒明条件下では通常ハエは無周期になるので、温度サイクル下で現れたリズムは温度サイクルが時計を駆動し、同調させることによるものであることは明らかである。われわれはこの現象を温度サイクル同調機構の解明のために利用できる

と考えている。

3. 分子メカニズム

TIMは、CRYが光を受容すると、プロテオソーム系によって分解される^{1,10)}。従って、恒明条件下ではTIMは恒常的に分解され、細胞質に蓄積しないことが想像される。これによってフィードバックループが停止し、歩行活動リズムが消失すると考えられる。上述の恒明条件下でも温度サイクルを与えることで活動リズムが回復する現象は、以下の2つの仮説で説明できる。1) 温度サイクルによって駆動する時計は既知のフィードバックループに依存しない新しい時計機構である。2) 温度サイクルには恒明条件下でもフィードバックループを駆動させる影響力がある。この2つの仮説を検討するために、われわれはまず無周期時計突然変異系統*per⁰*、*tim⁰*、*dClk^{JK}*、*cyc⁰*を用いて、温度サイクルに対する同調性を解析した^{25,30)}。これらの突然変異系統はすべて温度サイクルに同調したリズムを示したが、野生型の活動パターンとは大きく異なっていたことからPER、TIM、dCLK、CYCが温度サイクルへの同調に必須のタンパク質であることが明らかになった。従って、温度同調の背後にはフィードバックループが関与していることが予想された。

そこでわれわれは、抗PER抗体、抗TIM抗体を用いたウエスタンブロットにより、恒明温度サイクル下における時計タンパク質の周期的発現について解析を行い、フィードバックループが駆動しているかどうかを検討した。恒明温度一定下ではPER、TIMの発現量に周期的変動は見られず、どの時刻においてもほぼ一定になるが、温度サイクル下では明暗サイクル下と同様にPER、TIMが周期的に発現することが明らかになった(図3)³⁰⁾。この結果は、恒明下であっても、温度サイクルによってフィードバックループが駆動することを示唆している。Glaserらは*per*プロモーターの下流に*luciferase*を結合させた遺伝子を持つトランスジェニック系統を用いて、恒明温度一定下ではルシフェラーゼ活性に周期性は見られないが、温度サイクル下ではその温度サイクルに同調した周期的な活性が見られることを明らかにしている¹⁾。この結果もわれわれの結果と同様に温度サイクルによるフィードバックループの駆動を示唆している。しかし、なぜ温度サイクルによってフィードバックループが駆動されるのかは不明である。どのような経路(入力系)によって、どのように駆動される(フィードバックループの同調機構)

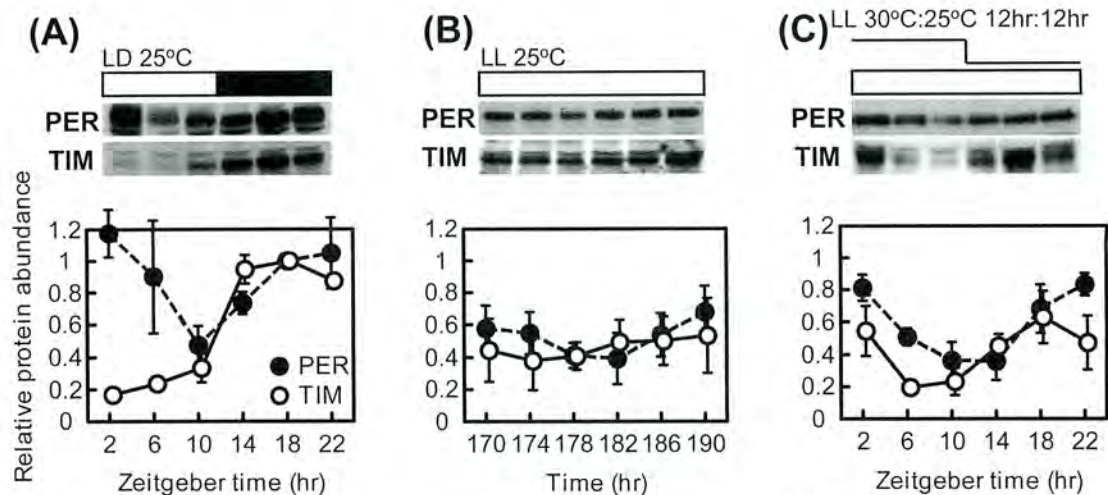


図3 明暗サイクル25°C一定下(A)、恒明25°C一定条件下(B)、恒明温度サイクル下(30°C:25°C 12hr:12hr)(C)における24時間のPER、TIMの発現パターンを示したWestern blotの結果。恒明25°C一定条件下ではPER、TIMの発現量はほぼ一定であるが、温度サイクル下では明暗サイクルと同様に周期的発現を示す。

のかを明らかにすることが今後の課題である。

Ederlyらの研究グループは、概日時計に対する温度の影響をいくつか報告している。彼らはまず、抗PER抗体、抗TIM抗体を用いたウエスタンブロットにより、PER、TIMタンパク質に対する熱パルスの影響を検討した²³⁾。25°Cで飼育したハエに37°Cの熱パルスを与えると、PER、TIMの発現量が急激に低下し、30分間の熱パルスでTIMはほぼ消失してしまい、PERもコントロールと比べると25%以下にまで低下した。彼らはその後、熱ショック遺伝子の転写活性化因子をコードする*Heat shock transcription factor*の突然変異体を用いて、熱パルスによるPER、TIMの分解にはheat shock系が関与しないことを明らかにしている²³⁾。また、Ederlyらは25°C一定、明暗サイクル下での歩行活動リズムに比べて、18°Cでは日暮れの活動ピークの位相が前進し、29°Cでは後退することを見出し、PER、TIMの発現パターンも活動リズムと同様に、18°Cでは位相前進し、29°Cでは位相後退することを見出した¹⁵⁾。これに関して、Majercakらは*per* mRNAの3' untranslated regionで温度依存的なスプライシングが起こり、低温下では高温下と比べてPERの発現ピークが位相前進することを明らかにしている。この温度依存的な*per*のスプライシングが温度サイクルの同調に関与している可能性については、Glaserらが否定しており、温度サイクル下ではアンスプライシング/スプライシングの割合が常に一定であることを明らかにしている⁴⁾。しかし、このような概日時計に関わる分子に対する温度の影響を詳細に検討することによって、

温度サイクルへの同調機構を明らかにする糸口がつかめるかもしれない。

われわれは最近、恒明条件下で、温度サイクルによる歩行活動リズムの駆動過程を明らかにするために、時計遺伝子mRNAレベルに対する温度ステップの影響を解析した。恒明条件下で20°Cから30°Cの温度ステップアップを与えた場合、*dClk* mRNA量は急激に増加し、*per*と*vri*は逆にmRNA量が急激に減少した。一方、30°Cから20°Cへの温度ステップダウンでは、それぞれの時計遺伝子のmRNA量は逆の反応を示し、*dClk*は急激に減少、*per*、*vri*は急激に増加した。また、*cyc*遺伝子は温度のステップアップ後もダウン後もmRNA量に変化はなかった。このことは、それぞれの時計遺伝子のmRNA量は温度の上昇、低下に対して別々の反応性を持つことを示している。温度サイクル下では温度上昇時と低下時に、時計遺伝子の発現量が補正され、正確に24時間周期の時計タンパク質の量的振動を引き起こすような仕組みになっているのかもしれない。温度変化に対する時計遺伝子発現の反応がどのような仕組みで生ずるのか、またそれがフィードバックループにどのように反映されるのかを今後明らかにせねばならない。

4. 温度サイクル同調に関与する脳内時計細胞

キイロショウジョウバエのPERは脳内で約150個程度の神経細胞で発現しており、それらの細胞は場所とサイズによっていくつかに分類される(図4)¹⁰⁾。前大脳背側の神経細胞群はDorsal neuron

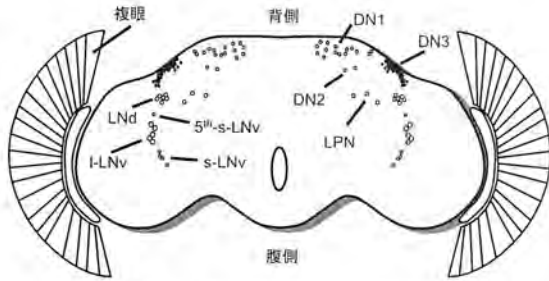


図4 脳内のPER陽性神経細胞を示した模式図。詳細は本文を参照。

(DN) と呼ばれ、それらはDN1、DN2、DN3の3つに分類されている。一方、脳側方部に位置する細胞群はLateral neuron (LN) と呼ばれ、それらはさらに背側の細胞群 (LNd)、腹側の大型の細胞群 (I-LNv)、小型の細胞群 (s-LNv) に分類される。時計の出力分子の一つと考えられているPigment dispersing factor (PDF) はI-LNvとs-LNvで発現している。これまでのところ、I-LNvの歩行活動リズムへの関与についてはほとんど証拠が得られていないが、s-LNvが歩行活動に関与することを示す結果は多く得られており、これらが最も重要なペースメーカーニューロンではないかと考えられている¹⁰⁾。RiegerらはPDFを発現しないs-LNv (5th s-LNv) を同定し、そのニューロンが歩行活動リズムに関与していることを示唆する結果を得ている²⁰⁾。われわれもCRYの機能欠損系統 cry^d を用いた研究から、LNv以外のPER発現細胞群も歩行活動リズムに関与していることを提案している²⁰⁾。これら以外の研究においてもしばしばs-LNv以外のPER発現細胞が歩行活動リズムに関与していることが示唆されていることから^{3, 8, 9, 24, 26)}、PDF陽性s-LNv以外のPER発現細胞群も歩行活動リズムに関与している可能性が強いと思われる。

われわれは歩行活動リズムの温度サイクル同調機構に関与する時計細胞を同定するために、抗PER抗体を用いた免疫組織化学により、恒明条件温度サイクル下でPERを周期的に発現する時計細胞の同定を試みた²⁰⁾。恒明条件温度一定下ではすべての時計細胞で、PERの発現が弱いもしくは消失していたが、温度サイクル下では明暗サイクル下と同様に、ほぼすべての時計細胞群でPERの周期的発現が観察された。さらに脳葉側方後部の神経細胞群 (LPN) で強いPERの周期的発現が新たに観察された。次に、温度サイクルに同調した活動リズムにLN群が関与しているかどうかを明らかにするために、PDF陽性

のI-LNvとs-LNvに細胞死が誘導されるトランスジェニック系統 $pdf-Gal4/UAS-rpr$; hid とほぼすべてのLN群を失っている $disco$ 突然変異系統を用いて活動リズムの解析を行った。その結果、LN群を欠くハエでも温度サイクルに同調して歩行活動リズムを示すことが明らかになった。 $disco$ 突然変異体を用いて恒明温度サイクル下でPERの周期的発現を免疫組織化学により解析したところ、DN3とLPNのみで明瞭な周期的発現が観察できた。この結果は、温度サイクルに同調して歩行活動リズムを駆動するためには、DN3とLPNがあれば十分であることを示唆している。しかし、 $disco$ 突然変異体の歩行活動リズムは野生型のリズムと比べるとかなり不明瞭であったことから、LN群も重要な役割を担うと考えられる。LPNの役割についてはこれまでのところほとんど情報がなかったが、われわれの研究によって、LPNが温度サイクル同調のために特別な役割を持つ時計細胞である可能性が初めて示唆された。

5. 温度入力系

キロショウジョウバエの温度受容機構はほとんど研究が進んでいない分野であると言ってもよいだろう。Sayeedらは、走温性の解析から触角が温度受容器として重要な役割を果たしていることを明らかにし²¹⁾、続いてZarは触角には低温を感知する温度受容器があることを提案している³¹⁾。しかし、概日時計の温度サイクル同調性には触角は重要でないようである。Glaserらは上述のように、 $per-luciferase$ ($per-luc$) を導入したトランスジェニック系統の温度サイクル下でのルシフェラーゼ活性を触角のないハエで測定し、そのルシフェラーゼ活性が野生型同様に温度サイクルに同調して周期的に変化することを明らかにしている⁴⁾。さらにGlaserらはルシフェラーゼ活性が温度サイクルに同調しなくなる突然変異体のスクリーニングを行い、 $norpA$ ($no\ receptor\ potential\ A$) と $nocte$ ($no\ circadian\ temperature\ entrainment$) の2つの遺伝子が概日時計の温度受容に関与していることを示唆する結果を得た (図5)³⁾。 $nocte$ はX染色体に位置する遺伝子であることが分かっているが、まだ正確な遺伝子座は公開されていない。またその遺伝子のコードするタンパク質や脳内の発現場所なども分かっている。 $norpA$ はPhospholipase C (PLC) をコードする遺伝子で、PLCはPhototransduction cascadeで Ca^{2+} の放出を引き起こすイノシトール3リン酸 (IP3) を生成する部分に関与している。つまり、 $norpA$ 遺伝子の温度受

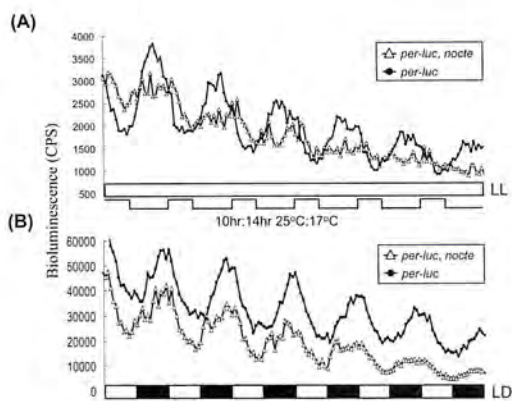


図5 温度サイクル下 (A) と明暗サイクル下 (B) における *per-luc*, *nocte* 突然変異系統のルシフェラーゼ発現の計測結果 (Glaser and Stanewsky (2005) より改変)。恒明条件、温度サイクル下 (10hr:14hr 25°C:17°C) (A) ではコントロール系統 *per-luc* は温度サイクルに同調した発光リズムを示すが、*per-luc*, *nocte* 系統の発光パターンに周期性は見られない。一方、明暗サイクル 25°C 一定下 (B) では両系統ともに明暗サイクルに同調した発光リズムを示す。

容への関与は、温度受容機構にも IP3 が関与するカスケードが存在することを示唆している。

Glaser らは、*per-luc* トランスジェニック系統の肢、羽、頭部、腹部、吻、脳をそれぞれ単離し、それぞれの器官におけるルシフェラーゼ活性を温度サイクル下で測定した⁴¹⁾。この結果、単離したすべての器官のルシフェラーゼ活性は温度サイクルに同調して、周期的に変化することが明らかになった。このことは、概日時計のための温度受容機構は頭部だけに存在するものではなく、からだの至るところに存在することを示している。一体どのような機構によって温度情報が時計に伝えられるのか、今後の発展が期待される。

6. 2 振動体モデルとの関係

Pittendrigh らは 1958 年にウスグロショウジョウバエを用いた研究により、羽化リズムは光感受性振動体と温度感受性振動体の 2 つの時計機構によって制御されていることを提案した¹⁷⁾。しかし、その後これら 2 つの振動体の正体について研究、考察している研究はほとんどなく、全く未解明のままである。われわれは、無周期時計突然変異体を用いた温度同調性の解析から、時計遺伝子 *per*、*tim* に依存しない振動機構が存在することを示唆する結果を得た²⁸⁾。*per*、*tim* の欠損突然変異系統 *per⁰¹*、*tim⁰¹* は恒暗温度サイクル下で内因性の時計によると思われる活動リズムを示した。一方、別の時計遺伝子 *dClk*、*cyc*

が機能欠損した無周期突然変異系統 *dClk^{dk}*、*cyc^{dl}* はそのような内因性のリズムは示さなかった。このことは、温度サイクル下では *per*、*tim* に依存しない *dClk*、*cyc* が関与する振動機構はたたくことを示唆している。この *per*、*tim* 非依存性時計機構が Pittendrigh の提案している温度感受性振動体に対応するかどうかに興味深い。また、脳内の PER 発現細胞の中に光感受性時計細胞と温度感受性時計細胞が存在する可能性も考えられる。われわれは上述のように、DN3 と LPN があれば、温度サイクルに同調して歩行活動リズムを駆動することが可能であることを明らかにした。このことは、DN3 と LPN が温度感受性の高い時計細胞であることを物語っている。特に LPN は、明暗サイクル下では明瞭な PER の発現が観察されないが、温度サイクル下では比較的強い PER の発現リズムを示す³⁰⁾。これは LPN が温度同調に関する特別な役割を担うことを示唆する。

7. 結び

概日時計の温度同調性の研究は始まったばかりであり、光同調性の研究と比べるとまだ発展途上である。しかし、現在のキョウジョウバエの研究技術や光同調性の研究で得られた知見を応用して研究を行えば、光同調性の研究に追いつくのもそう遠い話ではないと思われる。これまではわれわれの研究グループと Ralf Stanewsky のグループが温度サイクル同調性の研究を進めてきたが、現在は、その他いくつかの研究グループが温度同調性の研究に参入しているとのことである。このような流れも、研究を加速させる大きな要因となるに違いない。概日時計の温度同調には、重要な生物学的意義があると思われる。特にショウジョウバエのような小型の昆虫にとって極端な高温、低温は死活問題である。このような危険を回避するためには、光サイクルに同調するだけでなく、温度サイクルに同調し、危険な時刻を予測する必要があるだろう。もしかすると、温度は我々が考えている以上に概日時計にとって重要な同調因子なのかもしれない。今後も分子レベル、組織レベル、行動レベルで温度同調性の研究を進め、温度が同調因子として概日時計にどれほどの影響力を持つものなのかを明らかにしていく必要がある。

謝辞

図 5 の使用を許可してくれた Ralf Stanewsky と Franz Glaser に感謝いたします。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、岡山大学重点研究

プロジェクト「生命現象の多様なタイミング機構の総合的理解」の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P: *Science* 304:1503-1506 (2004)
- 2) Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J: *Cell* 112:329-341 (2003)
- 3) Dushay MS, Rosbash M, Hall JC: *J Biol Rhythms* 4:1-27 (1989)
- 4) Glaser FT, Stanewsky R: *Curr Biol* 15:1352-1363 (2005)
- 5) Grima B, Chelot E, Xia R, Rouyer F: *Nature* 431:869-873 (2004)
- 6) Hall JC: *Curr Opin Neurobiol* 10:456-466 (2000)
- 7) Hardin PE, Hall JC, Rosbash M: *Nature* 343:536-540 (1990)
- 8) Hardin PE: *J Biol Rhythms* 19:348-360 (2004)
- 9) Helfrich-Förster C: *J Comp Physiol A* 182:435-453 (1998)
- 10) Helfrich-Förster C: *Genes Brain Behav* 4:65-76 (2005)
- 11) Konopka RJ, Benzer S: *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2112-2116 (1971)
- 12) Konopka RJ, Pittendrigh CS, Orr D: *J Neurogenet* 6:1-10 (1989)
- 13) Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE: *Nature* 400:375-378 (1999)
- 14) Krishnan B, Levine JD, Lynch MK, Dowse HB, Funes P, Hall JC, Hardin PE, Dryer SE: *Nature* 411:313-317 (2001)
- 15) Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I: *Neuron* 24:219-230 (1999)
- 16) Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A: *Science* 285:1737-1741 (1999)
- 17) Pittendrigh CS, Bruce VG, Kaus P: *Proc Natl Acad Sci USA* 44:965-973 (1958)
- 18) Rensing L, Ruoff P: *Chronobiol Int* 19:807-864 (2002)
- 19) Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C: *J Biol Rhythms* 18:377-391 (2003)
- 20) Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Förster C: *J Neurosci* 26:2531-2543 (2006)
- 21) Sayeed O, Benzer S: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6079-6084 (1996)
- 22) Sidote D, Majercak J, Parikh V, Edery I: *Mol Cell Biol* 18:2004-2013 (1998)
- 23) Sidote D, Edery I: *Chronobiol Int* 16:519-525 (1999)
- 24) Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M: *Nature* 431:862-868 (2004)
- 25) Tomioka K, Sakamoto M, Harui Y, Matsumoto N, Matsumoto A: *J Insect Physiol* 44:587-596 (1998)
- 26) Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC, Stanewsky R: *Curr Biol* 13:1758-1767 (2003)
- 27) Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS, Hall JC: *J Biol Rhythms* 8:67-94 (1993)
- 28) Yoshii T, Sakamoto M, Tomioka K: *Zoolog Sci* 19:841-850 (2002)
- 29) Yoshii T, Funada Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K: *J Insect Physiol* 50:479-488 (2004)
- 30) Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K: *Eur J Neurosci* 22:1176-1184 (2005)
- 31) Zars T: *J Comp Physiol A* 187:235-242 (2001)
- 32) Zimmerman WF, Pittendrigh CS, Pavlidis T: *J Insect Physiol* 14:669-684 (1968)