

## 視交叉上核研究今昔

本間 さと<sup>✉</sup>

札幌花園病院睡眠医療センター

1972年に、哺乳類の生物時計が視床下部視交叉上核 (SCN) に局在することを示す2編の論文が発表され、半世紀がたった。この小さな神経核には、サーカディアンリズム発振、光同調、全身の末梢時計の同調などの機能がぎっしり詰まっている。その後、培養下での長期計測や移植なども可能となり、研究は飛躍的に発展した。21世紀の到来とともに、SCNは哺乳類唯一の概日時計から、末梢時計を統括する中枢時計へと、新たな機能が明らかとなってきた。SCNの組織学、リズム発振や同調に関わる分子メカニズム、細胞振動とネットワークなどについては多くのすぐれた論文や総説があるので、ここでは、SCN研究を巡る個人的な思い出、SCNの私的研究史について述べさせていただく。偶然にも1972年は私が大学院生として研究を開始した年であり、その後、SCNに深くかかわることになったことには運命を感じている。分散培養やスライス培養、マルチ電極ディッシュアレイ、マルチ機能の同時イメージングなど、新しいプロジェクトと技術開発は悪戦苦闘、挫折の連続ではあったが、今となっては、それもまた、楽しい思い出である。

## 1. はじめに

1972年に視交叉上核 (SCN) の破壊によりラットの行動<sup>1</sup>や副腎コルチコステロン<sup>2</sup>の概日リズムが消失したことを示した2編の論文が発表され、SCNが哺乳類の概日時計中枢であることが明らかになってから、今年が50周年である。

SCNの発見までは、概日時計があることにはあるが、特定の組織に存在するとは考えられていなかった。1972以降、1999年に末梢時計<sup>3</sup>の存在が明らかになるまではSCNが哺乳類では「唯一の」生物時計と考えられてきた。その後、SCNは「唯一無二」の生物時計から「one of them」となり、リズム発振よりも、むしろSCNが中枢時計として機能する中心的なメカニズム、すなわち振動ネットワークに注目が集まってきた。哺乳類が中枢神経内に全身をコントロールする中枢時計をもつ意義について再度、考え直す時期にきていると思う。

2. はじまりは *In vivo* 観察実験から

SCNが概日時計中枢であることを示した2編の論文は、これが大発見かと拍子抜けするほど、実に短い論文である。図表もろくにない。昨今ならば、とても査読を通りそうもない。Stephan & Zuckerの論文<sup>1</sup>ではSCNを破壊したラットの行動量を明期と暗期で統計

をとったデータに加え、2例で飲水リズムの消失と飲水および輪回し行動のリズムが消失していることを示しているだけで、周期解析や、破壊巣の顕微鏡写真も載っていない。Moore & Eichlerの論文<sup>2</sup>はShort Communicationであり、ただし、こちらは、破壊による副腎コルチコステロンリズム消失だけでなく、盲目にするとリズムがフリーランするが、Primary Optic tractの切断やAccessory optic tractの切断ではリズム同調が持続していること、SCNの尾側のHalasz knifeによる神経切断でもコルチコステロンリズムが消失するが吻側の神経切断ではリズムが持続することを報告し、SCNへの光入力視神経が脳内に入ってから生じていることや、SCNから尾側~背側方向の神経出力がHPA-axisへのリズム出力を支配していることを示している。SCNの破壊を、行動リズムではなく瞳孔の対光反射で確認している点も興味深く、短くても含蓄に富む論文である。信じられないかもしれないが、行動測定は、当時、測定機器が高価で多数を揃えることができず、コルチコステロン測定の方が容易であった。私の所属した当時の生理学教室も、毎日大量の血漿コルチコステロンの検体を測定していた。

しかし、正確には、これら2編の論文では、SCNは概日時計からのFinal Common Pathにある組織である可能性が否定できていない。1979年に、Inouye &

✉ sathonma@med.hokudai.ac.jp

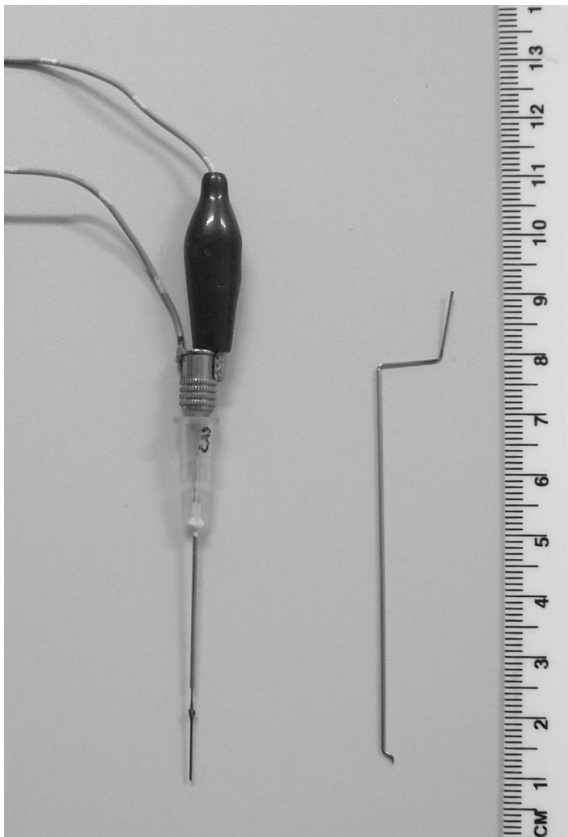


図1 Halasz ナイフ (右) と SCN 破壊のための手製電極 (左)

Halasz ナイフ (右): ステンレスパイプあるいは 21~23 号のカテラン針を 5~6 cm にダイヤモンドカッターでカット。ロールしていないピアノ線を 10 cm 程度にカットして、先端を三角形にグラインダーで削り、刃を作成する。刃は薄くて鋭いと切れがよいが、ナイフの刃を曲げる際、破損しやすい。目的とする大きさの刃を作ったら、ステンレスパイプに入れ、刃の方向にハンドルを作る。その際できる上下の「遊び」が、脳底に刃先が達したサインとなるので、遊びを 1 mm ほど作る。ナイフを脳底に下ろした際、ハンドル部分が浮き上がる瞬間をとらえて、脳底の位置を正確に記録し、そこから 0.5 mm 上げる。脳底部分の骨格標本をつくり、定位脳固定装置に設置して、ナイフが脳底ぎりぎりまで 360 度回転できるように、固定位置を決める。私が使っていた Wistar ラットでは上顎切歯の位置を耳穴より 5 mm 下げる位置で、SCN 部分の脳底が平らになった。

ラット視交叉上核破壊用電極 (左): Halasz ナイフ同様、二重構造とし、26~28G のカテラン針の先端をダイヤモンドカッターで切り落とし、マニキュアやカシューで絶縁コーティングし、ホルダーとなるステンレスパイプ (電極の太さに合わせ 22~23G から選ぶ) に入れる。ステンレス針の先端を研磨して絶縁を剥がし、常に一定の通電量が得られるようにし、壁面の絶縁は電気分解でチェックする (絶縁がはげると泡が出る)。電極の上部にストッパーのためのマニキュアの塊を付け、電極の上下方向に 1~1.5 mm の遊びを作る。脳底に電極が達したら、電極が持ち上がる。ここから 0.5 mm 上の位置で通電する。定位脳手術では、前後の原点は Bregma とするが、左右の原点は、上矢状静脈洞の中点とする。このため、SCN の前後を含み 5 mm ほどの正方形に頭蓋骨を剥がし、左右の中点を決め、硬膜下に脳実質を極力傷つけないように絹糸を通し、静脈洞を左右に牽引して出血を避け、正中線から左右 0.5 mm の位置で垂直に電極を下ろす。これで、X 軸と Z 軸方向の位置決め精度が上がる。

Kawamura の SCN island の論文が出て、初めて、SCN そのものが概日時計中枢であることが証明されたわけであり、2 名の日本人先輩の業績をいま一度強調しておきたい。

1972 年に大学院に入って与えられた最初のテーマは、指導教員の廣重力 助教授 (当時) がバイオアッセイ法を開発して取り組んできた CRH についてで、私の担当は CRH リズムの性差だった。Estrous cycle の変化が明暗サイクルの何時ごろに生じるか、という泥臭い予備実験から開始した。間もなく、当時、内分泌関連の雑誌に何報も論文が出ていた B. Halasz の開発した Halasz Knife を使って Hypothalamic island を作るようにとの指示が出た。Inouye & Kawamura の論文が発表される前であったので、先見の明があったわけであるが、どうやって Halasz Knife を作るのか皆目見当がつかない。Endocrinology に出ている図を参考に金属プレスで刃を作ってもらったりしたが、全く使い物にならなかった。今ならば、メールを出して著者に聞く、という手があるだろうが、当時は手紙もタイプライターの時代である。あてがなく、どうしたものかと思っていたところ、1973 年に京都で開催された日本内分泌学会総会で、UCLA の Sower のラボから帰国したばかりの林纈治 先生 (東京都神経研) が Halasz knife を仔ラットに応用した発表を聞くことができた。

会場で質問する勇気がなかったが、たまたま帰途の京都からの新幹線のホームで見かけて図々しく質問し、翌日、当時の勤務先であった国立がんセンターを訪ねて元祖 Halasz が作っていたナイフの作り方を教えてもらった (図 1 右)。以後、私も、実験手技を教えてほしいという申し出には、出来る限り丁寧に対応してきた。しかし、このナイフを使っただけの実験結果が論文になるには、さらに 10 年の月日がかかった (図 2 A) 5。

### 3. ほ乳類概日時計リズムの生後発達と母子同調: 「生みの親 vs. 育ての親」論争

生理学の教員として最初に取り掛かった研究テーマは、概日振動発振と母子同調であり、すでに教室では、盲目仔ラットの cortisol コルチコステロンリズムの生後発達を丹念に解析し、妊娠中の母親のリズムが基本的に仔のリズムを同調させるが、授乳中の母親のリズムも影響することがあると明らかにしていた<sup>6</sup>。一方、同様のテーマで研究をしていた高橋清久先生のグループでは、育ての親がリズムを同調するとデータの提示していた<sup>7</sup>。Reppert と Schwartz も母親による胎児 SCN の同調を発表しており<sup>8</sup>、概日時計の振動開始時期と母親による同調、出生後の非光同調の可能性といった、現在でも未解決の内容を含む研究テーマであったが、如何せん、当時は、離乳後にならないと表現型リズムが

測定できなかった。このため、実験デザインを工夫して、コルチコステロンや自発行動（当時ようやくアニメックスを複数台そろえて、自動解析ができるようになっていた）などのリズムを指標に、出生前にさかのぼっての振動発振を推測する方法を検討した。

胎児にとっての恒常状態を作るため、妊娠中のラットの SCN を破壊することを思いついた。そんなことをすると、流産や出産できない等の懸念はあったものの、まずはやってみるということで妊娠 3, 10, 17 日目に SCN を破壊し、仔は出生直後に盲目にし、リズムの消失した母親に離乳まで飼育させた。最初は、破壊巣が大きすぎて、母ラットのリズムは消失するものが出産できない場合がほとんどであり、帝王切開で出産させ、養母に育てさせなければならなかった。そのうちに腕を上げ、破壊巣を SCN に局限するようになると、出産・授乳が可能なラットが出てきた。妊娠 3 日の SCN 破壊では全例が流産してしまっていたが、妊娠 10 日および 17 日での破壊の結果から、母親による胎児のリズム同調と、母親の SCN 破壊による胎児のリズムのフリーラン開始を証明することができた<sup>9</sup>。ちなみに、メスの性周期が持続的に diestrus となるようでは、破壊巣が

SCN の尾側に大きすぎることを示しており、SCN に局限していれば、continuous estrus となる。この時の SCN 破壊方法と手製電極（図 1 左）は、その後数 10 年に渡り、教室内で継続して使われた。

生みの親か、育ての親かについては、親の子育てリズムの濃密さに依存して母親のリズムが非光因子として盲目仔ラットのリズムを同調することを示すことができ、論争に決着がついた。高橋先生のラボの母ラットは濃密な子育てをするが、我々のラボの母ラットの子育ては放任型であったことが分かり、仔の数が減らず（たとえば 2 匹）<sup>10</sup>、親に周期的制限給餌を課す<sup>11</sup>、周期的母子分離をする<sup>12,13</sup>等、母親のリズムが強く作用すると仔のリズムを同調することや、出生後初期ほど同調機能が強いことが分かり、ごく最近までラボの多くの教員や大学院生がこの研究に関わっている。

#### 4. 左右の SCN の存在意義

1982 年に、Turek らのグループが、Splitting を起こしたハムスターの片側の SCN を破壊すると、行動リズムが一相性になったことから、一对の SCN のそれ

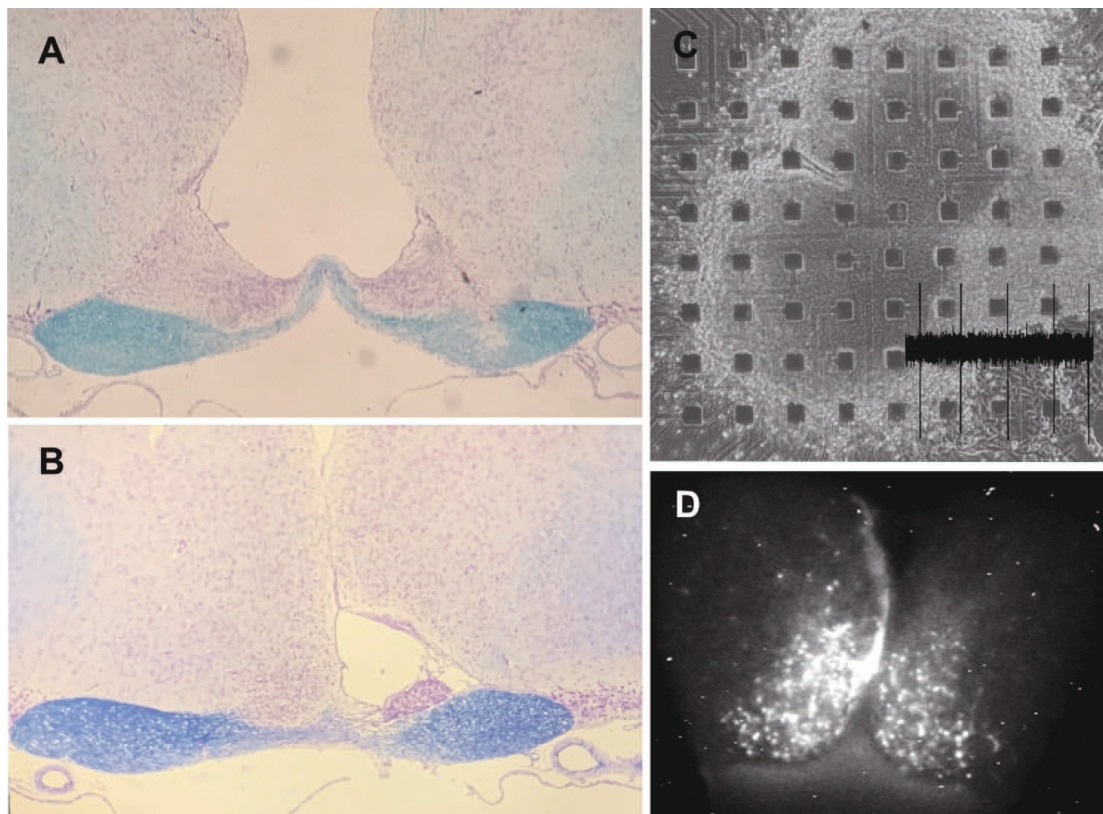


図 2 : SCN の in vivo, in vitro 実験

A : Halasz ナイフによる SCN を含む Hypothalamic island B : SCN 片側破壊。破壊巣の下にある組織は電気破壊後のグリア増殖 A,B はパラフィン切片、ルクソールファストブルー・クレシルバイオレット染色。C : マルチ電極ディッシュ上に培養したラットの SCN スライスと、右下は分散培養 SCN 神経の自発発火 D : 成獣 Per1-luc マウスの SCN スライスからの生物発光イメージ 2004 年ごろ単細胞レベルでの発光リズム計測ができるようになった初期のイメージ。

ぞれが二相性の行動の片方を支配しているとした論文を *Science* に発表して、反響を呼んだ<sup>14</sup>。ちょうど、行動リズムの開始位相と終了位相を指標にした PRC の形が異なる<sup>15</sup>、という仕事をしている最中であつたため、早速、片側 SCN 破壊で位相反応曲線を作ろう、ということになった。Splitting は行動リズムの背後にある E 振動体と M 振動体の脱同調による、と考えられていたため、片側を破壊すれば、この差が分かるかと予測した。しかし、片側 SCN を完全に破壊し、他側の SCN は完全に残す、というのは至難の業だった。ネジが摩耗して肉眼でもガタつきが分かる定位脳固定装置を騙し騙し使い、20 匹以上のラットを予備実験に費やして、何とかできそうな条件を見つけた(図 2 B)。Lesion 直後に屠殺して完全な片側破壊が得られているかどうかを凍結切片で確認、2 匹続けて満足のいく結果が得られたら、その条件で続けて 10 数匹の手術を行うという毎日で、手(装置)が安定せず本番の手術ができない日もあった。結局、片側 SCN 破壊ラットの PRC は両側が健全なものと同じで、行動リズムの光同調は片側で十分機能することが分かったが、F. Davis が片側 SCN 破壊ハムスターでも Splitting は起こるといふ論文を発表し<sup>16</sup>、Negative results の常で、データはお蔵となった。Davis らの論文も、大々的に発表された Turek らの論文に比較し、注目もされず、引用されることも稀であった。

一方、Turek らは、Splitting 中に LH サージも 2 相性になるという論文を発表し、左右それぞれの SCN が下流の機能を支配する non-redundant な存在であることを示し<sup>17</sup>、さらに 2000 年になって de la Iglesia と Schwartz が、Split したハムスターの時計遺伝子のリズムが左右の SCN でそれぞれ 180 度位相が逆転していたという発表もなされた<sup>18</sup>。左右の SCN のリズムは長期に培養しても同期している。培養下の左右逆転は、400 日を超える培養でバージニアのグループが観察した例がある<sup>19</sup>。また、*Cry1/Cry2* ダブルノックアウトマウスの新生児期の PER 2 リズムで最初の 2 サイクルほど逆位相でスタートしたのち、同期した例を見ているが、見つけたら論文にできるほど珍しい。左右の神経核の間には交連線維があり、神経性の連絡があるとは言われているが、その機能は不明であり、人為的な左右の位相乖離は未だにできていない。まだまだ謎の多い組織である。

## 5. マルチ電極ディッシュによる単一 SCN 神経細胞リズムの測定

SCN の分散細胞培養にチャレンジしたのは 1980 年

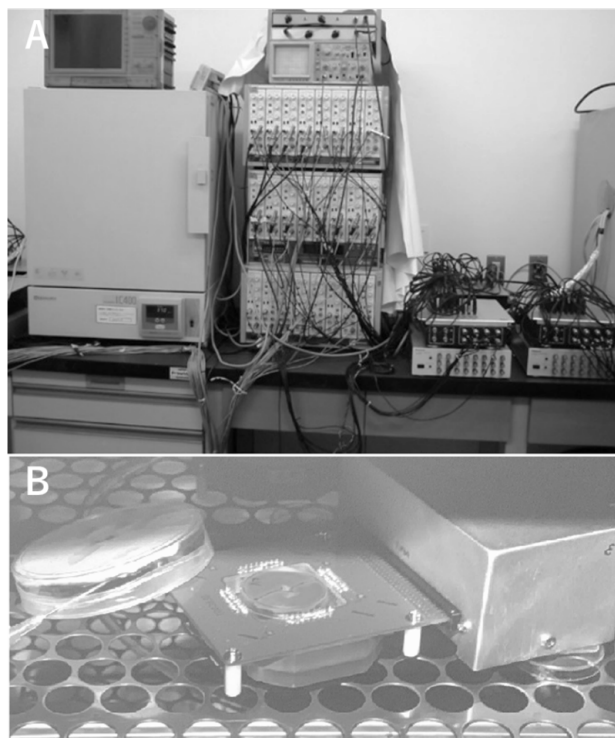


図3 8チャンネルMED測定システムを並べた自動測定系  
A: 64チャンネルの機器購入以後も活躍した8チャンネルのMEDシステム。発火頻度連続測定系はカスタムメイド。写真中央は、オシロスコープと、一定条件の波形を選択してパルス信号を出すウィンド型スライサー(1セット8台のウィンド型スライサーを3セット積み上げてある)。出力されたパルスは5分毎にPCに出力された。B: インキュベータ内にMEDのディッシュとホルダーを入れ、酸素透過フィルムを使うようになるまでは、10cmシャーレに濡れた脱脂綿を貼り付けてディッシュの上にかぶせ、内部に5%CO<sub>2</sub>/95%Airの混合ガスを流しっぱなしにした。

代の半ばだった。文献を調べ、肝臓などの初代培養をやったことのある研究仲間に聞きに行き、細菌学のラボでクリーンベンチがない場合の無菌操作を習い(アルコールランプがあれば、その直下は上昇気流ができるので、クリーンな空間ができる)と、努力を重ねたが、数年間にわたり成果が出なかった。細胞は全滅、培地には細菌が増え、抗生物質で細菌感染を抑えればカビが生え、培養室とはいえども天井からネズミの糞が落ちてくる始末であった。悪戦苦闘しているうちに、当時、高橋清久先生のラボにいた村上先生<sup>20</sup>と、獨協大の渡辺先生<sup>21</sup>が培養 SCN からの AVP リズムを測定し発表された。そこで、村上先生からは、無血清培地の組成や細胞分散法について、渡辺先生からは、グライナー社のクローニングプレートの中央の 4well だけに細胞をまいて、培地交換は細胞のない well で行う培養液回収法を教えてもらい、トリプシンを短時間作用させ、そのトリプシンをすっかり抜いた状態で、Fire-polish したパスツールピペットをフラッシュするという方法をとることで、Viability 90%以上を維持できる

ようになった<sup>22</sup>。いざ分散培養が可能になると、一細胞でのリズム測定をしたい。当時、NTTの研究所がマルチ電極アレイディッシュを開発し、成果を神経科学学会で発表していた。ポスター発表者に掛け合って、何とか使えないかと交渉したが、まだ開発段階にあるということで使わせてもらえなかった。その数年後、再度、学会会場で掛け合ったところ、すでにパナソニックが発売しているということを知り、早速パナソニックに「購入を検討するため」デモ機の貸出しを交渉した。この時、同時に不要となったディッシュを何枚か譲り受け、今度はMEDディッシュ上での培養法の確立に四苦八苦した。ディッシュ表面の疎水性が高く、特に新品では、表面のコーティングもできない状態だった。結局、バーナーの炎を絞り、ブルーフレームをさっと(0.2~0.3秒程度)ディッシュ表面に当てるのが最も親水性を上げることが分かった(ついでに滅菌もできた)。滅菌水で洗浄時に表面の親水性を確かめてからコーティングし、一晚、血清入りの培養液を入れてプレインキュベートすることでさらに親水性を上げるようにした。この後、ブルーフレーム法を、ガラス表面の親水性向上のため汎用した。SCNの分散培養は細胞が密なほど、元気よく培養できる。MEDプローブの中心にクローニングリングを立て、その中に高密度に細胞を撒くようになってから、高い確率で神経発火が測定できるようになった。一方、スライス培養では、組織の酸欠防止のため、培地の量を減らして組織を水没させない様にする必要がある。この時のコーティングについては、使用するコラーゲンの使用法を間違っ

とが、安定したスライス培養の鍵となった。新田ゼラチンが発売しているセルマトリックス I-C は本来ゲル化するコラーゲンではなく、ディッシュ表面のコーティング用であるが、これを I-A や I-P と同様の方法で「間違っ」てゲル化させたところ、きわめて薄いゲルを作ることができた。ただし、メーカー推奨法ではないので、ロットによっては、全くゲル化しない。顕微鏡でメッシュ状のゲルが出来るかどうかを調べ、「当たり」のロットであることを確認する必要がある。割安の大瓶を購入したところ、「外れ」でがっかり来たこともあった。結局、論文に書かけないような様々な、尚且つほんのちょっとした工夫が実験を成功させているので、継承のため努力が必要である。

MEDプローブ上での培養法の確立には苦労したが、デモ機での測定の方は意外なほど問題なくできた。最初の数枚で、すばらしくS/Nのよい単ユニット活動が記録でき、早速、大枚をはたいて、片手に載る、おもちゃのようなプロトタイプのMEDシステムを2台購入し、培養SCN細胞の電気活動測定が始まった(図2C)。1998年にSCN神経細胞活動の周期分布を発表したが、これがパナソニックのMEDシステムでの論文第一号となった。野生型にも関わらず、発火頻度の周期が20~30時間まで広く分布したのは驚きだった<sup>23</sup>。そして、その後の単一細胞時計とネットワーク形成による組織レベルの研究の出発点となった。この段階では一度に測定できる電極が8チャンネルであったため、64チャンネルの電極の中からどの8チャンネルを選んで測定するかは悩ましかった。発火のある神経細胞は、1日中



図4：カスタマイズの生物発光システムとラボ培養・測定室風景  
 A：生物発光測定装置3号機、顕微鏡ステージ上にはアクリルのカスタマイズミニインキュベータ、左側の温風装置から一定温度の温風と温めた蒸気を送る。酸素透過フィルムを使うようになってからは加湿器が不要となり、段々安価で作れるようになってきた。B：2009年の培養・測定室風景。後方には発光・蛍光・電気活動などの同時測定のための遮光テントが並ぶ。

発火している SCN 外の細胞であることが多く(このため、チャンネル選択の時に容易に見つかる)、一方、明瞭なリズムをもつ SCN 細胞は、1 日にせいぜい 4~5 時間程度しか発火しないものが結構ある。当たりが出るかどうかは by chance であった(図 3)。その後、さらに大枚をはたいて 64 チャンネルが同時測定できるシステムを購入し、実験の効率がぐんと上がった。さらに、二色の発光(二種の時計遺伝子発現)と蛍光(カルシウムセンサー)を加えて 4 機能同時測定も可能となった<sup>24</sup>。その際、長期の培養測定では常識化していた倒立顕微鏡をやめ、正立顕微鏡とカスタムメイドのミニインキュベータを使うことで、電極によってさえぎられることなく全視野の発光・蛍光が測定できるようになった。拡張性があるのは、カスタムメイドの測定系であり、LV200 などの高価な機器にできないことが色々可能であったが、ラボの中に場所をとる遮光テントがずらっと並ぶ結果となった(図 4)。

## 6. ペースメーカーの安定性 : SCN は cramp を起こさない

最初はおっかなびっくり、腫物に触る様に扱っていた SCN であるが、そのうちに中枢神経組織としては、例外的に培養下でも丈夫で長持ちする組織であることが分かった。

MED システムで測定を始めた当初は、乾燥を防ぎながら pH を維持する努力をしていた。培養条件を一定するため、何年間かの間、毎日培地を半量交換するという金魚の世話のようなことをしていたが、酸素透過フィルムを使うようになってから不要となった。また、pH については、空気中で中性を維持できるよう、HEPES と NaHCO<sub>3</sub> の量を加減した。発火は、上述したように 1 日の一定時間のみで頻度も低い。結局 5%CO<sub>2</sub> も培養液の補充もせずに延々とリズムが測定できるようになった。シアノバクテリアの Kai も ATP をほとんど使わないそうであるが、SCN も、リズム発振を測定する限り、ほ乳類組織としては驚くほど栄養補給が不要の組織である。要するに、概日時計は非常にエコなシステムなのである。

一度、対照実験のため、SCN 外の中枢神経細胞を分散培養してみて驚いた。SCN 神経細胞は、ドイツシュに撒いた翌日には、せいぜい細胞体の 2 倍程度の神経突起しか伸ばさないで、中枢神経細胞はこんなもの、と思っていたが、線条体や大脳皮質の神経細胞は、数時間でめきめきと神経突起を伸ばし、翌日には盛大に同期した発火を示す。一定閾値以上のスパイクを拾うと音がなるようにセットしておくと、培養室からは周期的な神経バーストの音楽が聞こえてくる。2002 年に米国神経科学会でのミニワークショップで MED シス

テムについての講演をしたところ、「SCN は cramp を起こさないのか?」という質問が来た。そういう発想がなかったので質問内容に驚いたが、確かにペースメーカーには cramp を起こさない仕組みがある。生理学の講義では心筋細胞の電気活動を講義するが、200 ミリ秒も続くプラトー相があり、絶対不応期が長い。心筋細胞が cramp を起こせば一巻の終わりであり、滅多なことで cramp が起きないようにしている。SCN 細胞も、中枢神経の他の部位のようなバースト発火を起こさない仕組みができていて、それが分かったのはごく最近である。SCN の神経細胞は、ほぼ 100%GABAergic であるが、その生理的意義は不明であった。GABA が無い場合はどうなるか? GABA のロックアウト(GABA が産生できない GAD65/GAD67 ダブルロックアウト、および GABA が放出できない Vesicular GABA transporter ロックアウト)は呼吸不全で生後すぐに死亡するが、胎児は出産時まで育つ。そこで、胎児 SCN の培養したところ、SCN 細胞の時計遺伝子発現は、野生型と全く同じであった。ここまでは薬理実験による先行研究結果から推測は出来たが、自発発火は周期的な SCN 全体で同期したバーストを示すことが分かった。GABA がなくなったことで、SCN の神経発火は、SCN 外の中枢神経細胞並となっていた<sup>25</sup>。SCN のペースメーカーが cramp を起こさない仕組みの少なくとも 1 つは、ほぼすべての神経細胞が GABAergic であることにあった。しかし、SCN 神経細胞が、他の脳部位の神経細胞に比較して、神経突起を伸ばさない理由、SCN のペースメーカーがエコなシステムであるメカニズムは、まだよくわかっていない。

半世紀の時を経て、視交叉上核にはまだまだ謎が多い。若手の皆さんが、ぜひ、この魅力的な神経核の謎解きにチャレンジしていくことを切に願っている。

## 参考文献

- 1 Stephan, F. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**, 1583-1586 (1972).
- 2 Moore, R.Y. & Eichler, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206 (1972).
- 3 Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-695 (2000).

- 4 Inouye, S.T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5962-5966 (1979).
- 5 Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Dissociation of circadian rhythms in rats with a hypothalamic island. *Am. J. Physiol.* **246**, R949-R9541 (1984).
- 6 Hiroshige, T., Honma, K. & Watanabe, K.J. Prenatal onset and modification of the circadian rhythm of plasma corticosterone in blinded infantile rats. *J. Physiol.* **325**, 521-32 (1982).
- 7 Sasaki, Y., Murakami, N. & Takahashi, K. Critical period for the entrainment of the circadian rhythm in blinded pups by dams. *Physiol. Behav.* **36**, 723-736 (1984).
- 8 Reppert, S.M. & Schwartz, W.J. Maternal coordination of fetal biological clock in utero. *Science* **220**, 969-970 (1984).
- 9 Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* **114**, 1791-1796 (1984).
- 10 Honma, K., Honma, S., Shirakawa, T. & Hiroshige, T. Phase-setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* **252**, R256-R261 (1987).
- 11 Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Restricted daily feeding during nursing period resets circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* **252**, R262-R268 (1987).
- 12 Ohta, H., Honma, S., Abe, H. & Honma, K. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 1628-1634 (2003).
- 13 Yoshikawa, T. *et al.* Daily exposure to cold phase-shifts circadian clock of neonatal rat *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **37**, 491-497 (2013).
- 14 Pickard, G.E. & Turek, F.W. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science* **215**, 1119-1121 (1982).
- 15 Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Response curve, free-running period, and activity time in circadian locomotor rhythm of rats. *Jpn. J. Physiol.* **35**, 643-58 (1985).
- 16 Davis, F. & Gorski, R. Unilateral lesion of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J. Comp. Physiol. A* **154**, 221-232 (1984).
- 17 Swann, J.M. & Turek, F.W. Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science* **228**, 898-900 (1985).
- 18 de la Iglesias, H.O., Meyer, J., Carpino, A.Jr. & Schwartz, W.J. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* **290**, 799-801 (2000).
- 19 Yamazaki, S. & Takahashi, J.S. Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol.* **393**, 288-301 (2005).
- 20 Murakami, N. *et al.* Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res.* **545**, 347-350 (1991).
- 21 Watanabe, K., Koibuchi, N., Ohtake, H. & Yamaoka, S. Circadian rhythms of vasopressin release in primary cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **624**, 115-120 (1993).
- 22 Honma, S., Katsuno, Y., Tanahashi, Y., Abe, H. & Honma, K. Circadian rhythms of arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide do not depend on cytoarchitecture of dispersed cell culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **86**, 967-976 (1998).
- 23 Honma, S., Shirakawa, T., Katsuno, Y., Namihira, M. & Honma, K. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* **250**, 157-160 (1998).
- 24 Ono, D. *et al.* Dissociation of *Per1* and *Bmal1* circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E3699-E3708 (2017).
- 25 Ono, D., Honma, K., Yanagawa, Y., Yamanaka, A. & Honma, S. GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice. *Commun. Biol.* **2**, 232 (2019).