

視交叉上核のリズム発現と細胞間カップリング

本間さと

北海道大学医学部生理学第一講座

SCN の発見とその意義

哺乳動物におけるサーカディアンリズムの formal properties をすでに 1920 年代から報告していた Richter は、これらを支配している生物時計の存在を、数十年に渡り探し続けた。その局在部位が明らかになったのは、1972 年であり、Stephan と Zucker、Moore と Eichler の 2 つのグループがラット視交叉上核 (SCN) の破壊で、前者は行動リズムが、後者は血漿コルチコステロンリズムが消失することを報告したことによる。その後、SCN が生物時計からの pathway にあたるのではなく、時計そのものの局在部位であることを、Inouye と Kawamura (1979) が明らかにして以来、SCN におけるサーカディアン振動機構の研究において、わが国の研究は常にトップレベルを維持している。哺乳動物におけるサーカディアン振動体の局在が明らかになったことで、その後の研究は大きく発展した。神経核内の細胞構築が明らかにされ (van den Pol, 1980, van den Pol and Tsujimoto, 1985)、電気生理学的手法 (Green and Gillette 1982, Shibata ら 1982)、器官培養 (Earnest and Sladek, 1987, Tominaga ら, 1993, Shinohara ら, 1994)、細胞培養 (Murakami ら, 1991, Watanabe ら, 1993)、移植 (Lehman ら, 1987, Saitoh ら, 1987) 等の技術が導入され、さらには昨年の clock gene のクローニング等の分子機構へのアプローチが可能となったわけである (King ら, 1997, Tei ら, 1997, Sun ら, 1997)。サーカディアン振動の発現と光同調機構がこの小さな一對の神経核に集中しているため、SCN は、複雑な哺乳動物の中樞神経機構の中でも、分子レベルから

個体の機能までの解析が可能な、優れた実験系を提供している。

多振動体ペースメーカーとしての SCN

SCN はラットでは一側、約 8,000 から 10,000 個の神経細胞から構成される (van den Pol, 1980)。これらのどの細胞がサーカディアン振動を発現しているか、あるいはすべての細胞が振動を発現しているのか、そのメカニズムは長い間不明であった。図 1 は、多数の神経細胞から構成される SCN 内からのサーカディアンリズム発現の可能性を示したものである。過去の破壊実験からは、SCN が完全に破壊されない限り、行動やホルモンのサーカディアンリズムが存続することがわかっており、少数の振動細胞によるリズム発現の可能性 (図 1a) は否定的であった。しかし、移植実験では、移植片中の特定細胞、例えば VIP 細胞 (Sollars と Pickard, 1995) や Ca 結合蛋白 (Silver ら, 1998) の生着とリズム発現の相関が報告されており、サーカディアンリズムの発振と表現に、SCN の特定細胞が関与している可能性を示唆する結果も報告されている。大脳皮質などでいわれている神経ネットワークによるリズム発現の可能性は (図 1b)、テトロドトキシン投与で行動、ホルモン、神経活動といった表現型リズムは一時的にマスクされるが、サーカディアン振動は持続していることが、個体レベル (Schwartz ら, 1987)、神経核レベル (Shibata and Moore, 1993)、SCN 神経細胞レベル (Welsh ら, 1995) で明らかにされることで、否定された。ただし、これらの結果は、振動細胞間連絡がシナプス連絡である可能性を否定するものでは

ない。また、テトロドトキシンは Na チャンネルを介する連絡のみを抑制するため、それ以外の機序での神経連絡による、リズム表現の可能性もある。図1cに示したSCNにおける振動共役説は、たとえ個々の細胞振動が減衰性であっても、あるいは不安定であっても、互いに影響しあうことにより、高精度高振幅のサーカディアン周期を発現するという振動理論(Enright, 1982)から、SCNでの安定した高振幅のリズム発現の機序として推測されているものである。行動リズムの詳細な機能解析により、夜行性齧歯類のサーカディアンペースメーカーが、朝方と夕方を支配する二つの振動体から構成されることが示唆されており(PittendrighとDaan, 1976)、この齧歯類生物時計の二振動体仮説も、両者に支配されるリズムが共にSCN破壊で消失するため、振動共役説を支持するものと考えられる。SCNの部分破壊でフリーラン周期が短くなる(Rietveld, 1984)という、細胞数が周期に影響する結果も、振動共役による安定したサーカディアン周期発現の可能性を支持している。

培養SCNによるSCN内多振動体の発見

1995年に発表された二つのSCNの *in vitro* 実験結果は、これらの議論に終止符を打つものであった。一つは Shinohara らの、SCN の organotypic slice culture におけるペプチドリズムの報告であり、もう一つは Welsh らのSCN神経細胞の多電極ディッシュ上での分散培養の報告である。Shinohara らの結果は、分裂阻止剤の投与により、バゾプレッシンとVIP(vasoactive intestinal polypeptide)のリズムが異なる周期でフリーランすることを示し、同一ペプチド細胞間ではリズム同期が維持されること、異種ペプチド間ではリズムが解離しうることを明らかにしたものであり、一方、Welsh らの結果は、個々の神経細胞が脱同調して独自のフリーランリズムを示すことを明らかにした。これらの結果により、SCNは multi oscillatory system であること、さらに培養条件により振動細胞の同期、脱同期が生じることが分かった。

ラットSCNの無血清培地による分散培養では、すでに Murakami らが約 27 時間周期のバゾプレッシンリズムを発現することを報告し(1991)、一方、Watanabe らは、約 24 時間周期のバゾプレッシンリズムの発現と、母親の昼夜逆転によるリズム逆転を報告している(1993)。

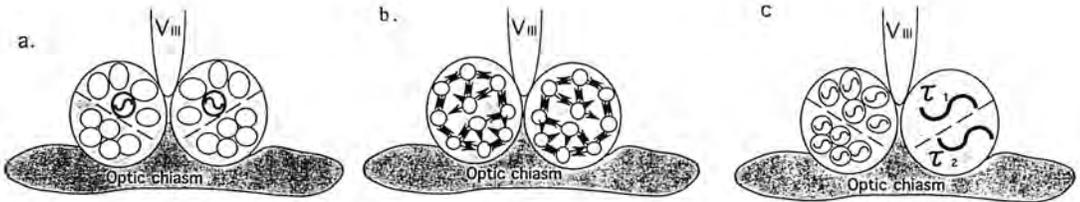


図1: 視交叉上核におけるサーカディアンリズム発現とその表現の3つの可能性

- a: 単一(あるいは極少数の)振動体細胞のみが振動を発現する場合。
- b: 個々の細胞は振動体を持たないが、ニューラルネットを形成して振動を発現する可能性。
- c: 個々の細胞が独自の振動体を持ち、振動共役して、全体として1つのリズムを発現する可能性。右側核の図は、背内側と腹外側で別の周期を持ちうる可能性を示したもの。

我々は、同様の無血清培地によるラットSCN分散培養で、培養開始 24 時間後から、バソプレッシンと VIP が同期したリズムを示すことを確認した。ディッシュ表面のコーティング条件により培養1~2週間目には細胞分布に大きな差が見られ、また、培養初期の分裂阻止剤処置では、グリア細胞の数が極めて少なくなり、形態も細く分岐した突起を多数もつもののみとなったが、2つのペプチドの同期したリズムはこれらの変化には影響されないことを報告した(Honmaら,1998)。これら一連のSCN分散培養におけるペプチドリズムの結果は、同一ディッシュ内の個々の神経細胞発火リズムが脱同調しているという Welsh らの結果とは、一見矛盾するものである。しかし、もし、同じSCNの分散培養でも、条件により振動細胞が同調したり脱同調したりするならば、両培養条件の差に、*in vivo*での振動細胞間の安定したカップリング機序を解明する鍵があるかもしれない。そこで、我々は、Welsh らと我々の培養条件の間で最も差があると考えられる培地中の血清レベルに注目し、無血清培地と牛胎児血清(FCS)を含有する培地でのペプチドレベルを比較した。その結果、5~10%FCS含有培地では、多くの例でサーカディアンリズムが検出できないことを見出した。さらに、彼らと同様に、マルチ電極ディッシュを用いて、ペプチドリズムと個々の神経活動リズムを比較した。松下のマルチ電極ディッシュの表面素材は、Welsh らの用いたディッシュと同一と考えられるので、1~2.5%FCS含有培地で培養し、ペプチドレベルと個々の神経活動リズムとを比較してみた。残念ながら、発火頻度が培地の交換や振動により数10分から1時間程度マスキングを受けることがあるため、ペプチド解析のサンプリングを行った直後から電気活動を調べるという方法をとった。その結果、有意のサーカディアンペプチドリズムが検出できる例では、同一ディッシュ上で記録

した複数の神経活動リズムが同期しており、ペプチドリズムの検出できなかったディッシュでは、個々の神経活動にはサーカディアンリズムが存在するが位相、周期がそれぞれ異なることを見出した(図2)。また、20枚のマルチ電極ディッシュから10秒間隔で連続2~6週に渡り自発発火頻度を測定した88個の神経細胞活動記録のリズム解析を行ったところ、連続5サイクル以上のサーカディアンリズムを示した神経が67個存在した(76%)。これらの実験結果から以下のことが示唆された。

1. SCNの神経細胞の多くはサーカディアン振動体を有する。
2. 個々の振動細胞は、独自の周期でフリーランしうるが、振動細胞間同調も存在する。
3. 培養細胞におけるペプチドリズムの消失は、SCN振動停止ではなく、個々の振動細胞の脱同調を反映している。

振動細胞間カップリング

振動細胞が互いに連絡しあい、リズムの周期と位相を一致させるカップリングのメカニズムは、未だ明かでない。神経組織内でカップリングを可能とする機序としては、シナプス連絡、液性(ガス性)連絡、ギャップ結合などが考えられる。また細胞間の接近や接着には、細胞外マトリックスや各種接着因子、成長因子などの関与も考えられる。

- 1) シナプス連絡によるカップリングの可能性
先にのべたテトロドトキシンの実験結果から、細胞内でのリズム発振にはシナプス連絡は不要であることが明かとなったが、この実験結果からは、細胞間のカップリングがシナプス連絡を介するかどうかは不明である。そこで、マルチ電極上分散培養で、4~8個の神経から同時に記録される自発発火パルスデータを用い、cross correlation 解析を行ったところ、同期した神経活動リズムを示す神経細胞のいくつか

が数 m sec の差で発火していることが確認された。この事実は、少なくとも、分散培養SCN神経細胞間では単シナプス連絡でリズムが同期する可能性を示唆している。ただし、*in vivo*で、同一の機序が存在するかどうかは不明である。

液性の因子がSCN内で何らかの情報伝達を行っている可能性は、これまでの多くの実験結果から示唆されている。特に、仔ラットのSCNが胎生期にサーカディアン振動を開始し、母親のリズムに胎内同調していることが分かっており(Reppert ら,1983)、SCNを破壊した母ラットの仔は、胎内でフリーランを開始することが示

2) 液性、ガス性連絡

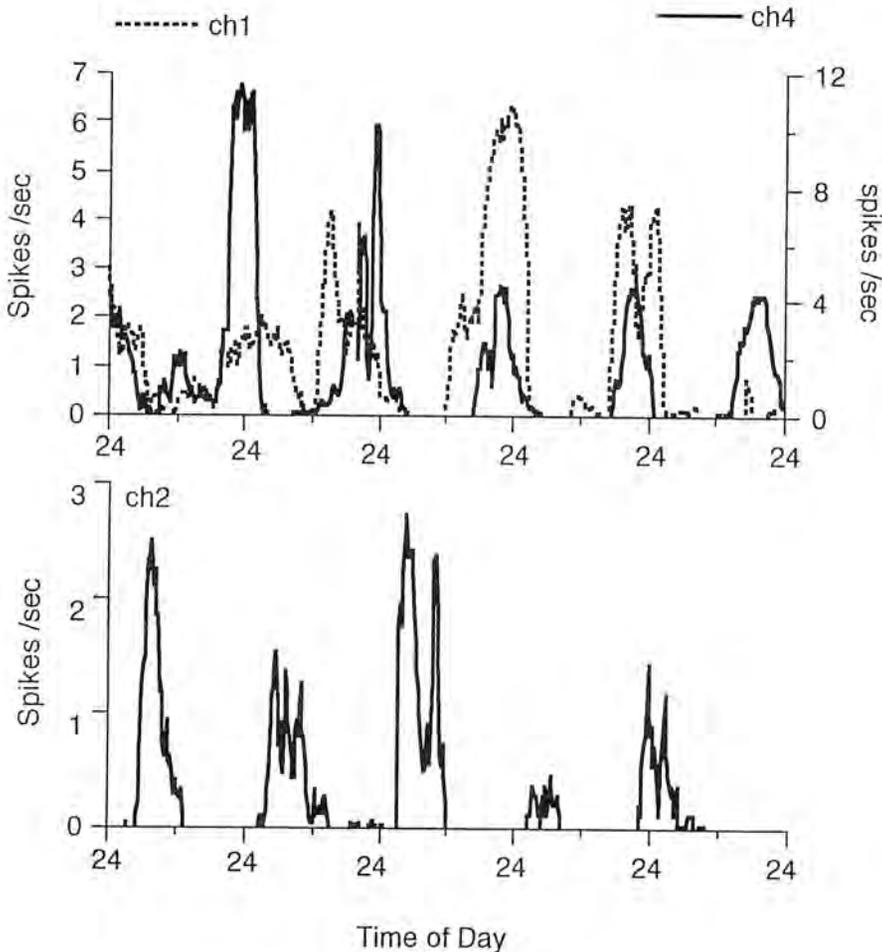


図2: マルチ電極ディッシュ上で培養した視交叉上核神経細胞活動リズム

同一ディッシュ上の3つの神経細胞の発火頻度を示した。周期は ch1 が 23.8 時間、ch2 が 22.6 時間、ch4 が 23.4 時間。ch1,4 は位相、周期ともほぼ一致しているが、ch2 は周期がやや短く、位相がほぼ逆転している

唆されている(Honma ら,1984)。これらの実験結果は、シナプス形成以前の胎児 SCN が母親の血中の物質あるいは環境因子を何らかの機序で感受し、リズム同調していることを示している。胎盤を介して作用した物質による胎児リズムの同調としては、メラトニン(Grosse ら,1995)およびドパミン作動薬(Viswanathan ら,1994)の例がすでに報告されている。また、Silver ら(1996)は、一定分子量以下の物質のみを通過させる膜でできたチューブにSCN の組織を入れてSCN破壊ハムスターに移植すると、行動リズムが回復することを報告している。NO のSCN内での作用も報告されており(Ding et al,1995)、CO なども含め、各種の diffusible substance の関与も検討の必要がある。

これまで述べてきたような *in vitro* 実験系では、カップリングが液性連絡によるのか、神経性連絡によるのか、区別がつけにくい。電気刺激を行えば、シナプス連絡の存在は明らかになるが、そのシナプスがリズムカップリングに関与しているかどうかは確定できない。培養条件下で液性連絡によるカップリングが存在するかどうかは、現在各社から発売されているカルチャーインサート等の membrane を用いて行うことができるが、位相・周期の異なる2組のSCN細胞が液性連絡によって同期するかどうかを検討した実験は未だ報告されていない。

シナプス形成や神経細胞機能維持には、各種の成長因子の関与が示唆されており、新たな成長因子の発見が続いている。Nerve growth factor のサーカディアンリズムへの関与も報告されており(Bina と Rusak,1996)、これらのどの因子が振動細胞カップリングにどのように影響しているかも、今後の研究課題である。

3) ギャップ結合

一方、我々が行ったマルチ電極上SCN分散培養細胞の cross correlation では、二神経の

発火にほとんど時間差がない例も見つかった。この場合は、記録をとった2つの神経細胞は、それ自体自律振動を行わないが、振動細胞から等距離でシナプス連絡を受けていることで説明可能であるが、両者がギャップ結合を介して同時発火していることも否定できない。これまでの電子顕微鏡によるSCNの観察からは、SCN神経細胞間のギャップ結合は確認されていない。単一神経細胞への Neurobiotin 等の色素注入による dye coupling を調べた結果では、SCN神経細胞間の electrical synapse の可能性を示すものもある一方(Jiangら,1997)、グリア間にはギャップ結合があっても神経細胞間の dye coupling はないという報告もある(Welsh と Reppert,1996)。electrical synapse は、複数の神経細胞を機能的合体体とするため、色々なアプローチにより、SCNにおける存在の有無を明らかにしていく必要がある。

グリア細胞はギャップ結合を介して緊密な連絡している。特に、SCNは、アストロサイトのマーカー蛋白である Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) が、他の視床下部組織に比べ極めて濃く染色されること(Morin ら,1989)、GFAP の分布にサーカディアン変動があること(Lavialle と Serviere,1993)等の報告からも、アストロサイトがサーカディアン振動において何らかの機能を発揮している可能性がある。培養系では、グリアの種類および数が培地条件によって大きく影響される。血清含有培地での培養では、いわゆる Type I グリアがディッシュ面を敷石状に張りつめ、グリア細胞間に多数のギャップ結合による密接な連絡が生じる(Welsh と Reppert,1996)。上に述べたように、この状態では、ペプチドリズムが消失する例が多い。一方、無血清培地では、グリアの増殖が抑制され、細い突起をもつ分化したグリアが神経細胞と網目構造を形成する(Honma et al,1998)。この状態では、同期したペプチドリズムが観察される。ま

た、SCN以外の部位や、培養グリア細胞では、血清を抜いてグリアを分化されると神経伝達物質のレセプター数が cAMP やアラキドン酸などの系を介して増加し(Murphy,1987, Barres,1991)、また、VIP,PCAP がグリアの機能を調節すること(Grimaldi ら,1994, Tatsuno と Arimura,1994)などが報告されている。このため、グリアのもつギャップ結合以外の細胞間情報伝達の可能性も考慮に入れる必要があると考えられる。

4) その他の可能性

SCNの分散細胞培養では、神経細胞間にシナプス連絡がなされていない培養開始時から同期したペプチドリズムが見られたが(Honma ら,1998)、これは、母親のリズムに同調した個々の振動細胞リズムを反映していたのかもしれない。*in vivo*での安定したサーカディアンリズム発現には、細胞間の接近や特殊な細胞配列が重要であるかもしれない。事実、視交叉上核細胞には、中枢神経ではめずらしく、神経細胞が soma を接して配列する構造がみられる(van den Pol, 1991)。成長因子と同様、細胞接着因子も、最近数多く発見されており、神経細胞間、グリア間、神経細胞・グリア間の接着因子がカップリングに何らかの作用をもつ可能性がある。Glass らは、SCNに NCAM(neuronal cell adhesion molecule)が多く発現していることに注目し(1994)、NCAM knock out mice でサーカディアンリズムを調べたところ、heterozygote では短周期を、そして homozygote では無周期性を示すことを見出した(Shen ら,1997)。この結果は、NCAM が振動発現そのものに必要である可能性も示しているが、リズムカップリングに必要であり、NCAM knock out のためカップリング障害が生じ、短周期や無周期が出現したとも解釈できる。同様に、Takahashi らのグループが mutagen を作用させた mice の中

から見出したリズム変異体の Clock mice は、heterozygote ではリズム周期が正常よりも長いこと、homozygote では連続暗で直ちに arrhythmic となることが特徴である(Vitaterna ら,1994)。行動などの表現型リズムの無周期性は、1.サーカディアン振動の停止、ペースメーカーを構成している複数の振動体間の脱同期、3.表現リズムとの間のマスキング(ペースメーカーの振動は持続)の可能性が考えられる。連続暗の下で 27 時間という長い周期でフリーランした後行動リズムが無周期となったクロック変異マウスに 6 時間の光照射を行うと、リズムが再び発現することが報告されている。この事実は、振動細胞間の脱同調を生じた結果、行動リズムが消失した可能性も示唆している。

おわりに

哺乳動物では、個体レベルで安定したサーカディアン振動、光同調が長い寿命の間維持されている。しかし、個々のSCN細胞の振動は、環境条件で大きくばらつき、脱同調によってSCN全体ではサーカディアン変動が消失することも明らかにされた。安定したリズムの発現には、多数の振動細胞のカップリングが必須と考えられる。哺乳動物のサーカディアンリズム発現機構の探求は、やっと分子レベルでの研究がスタートしたばかりである。次々と明らかにされていく遺伝子群の内、リズムの発振や光同調と同時にリズムカップリングに関わる遺伝子も、個体のリズム発現に必須の「時計遺伝子」の1つとして重要な位置を占めると考えられる。

この様に、最近の実験技術の発展により、SCNは、中枢神経のなかでも、おそらく唯一、*in vitro*で一個の神経細胞のモニタリングからでもその機能が解析できるという、すばらしい実験系となった。今後さらに reporter gene, transgene, knock out, cell line 化などで、機能

解析に大きな発展が期待できる。リズム研究の特徴の一つに、振動理論、あるいは下等生物における発見をもとに、仮定を立てて実験を行うことが可能な点がある。そこで、若い研究者の方々は、行動リズムなど、個体レベルでの機能解析によって明らかになった生物時計の基本を忘れずに、先端技術を応用することにより、この素晴らしい実験系を存分に生かした研究をしていただきたい。

文献

- Barres, B.A. (1991) New roles for glia. *J. Neurosci.* 11:3685-3694.
- Bina K.G. and Rusak B. (1996) Nerve growth factor phase shifts circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Neurosci. Lett.* 206, 97-100.
- Enright, J.T. (1980) The Timing of Sleep and Wakefulness, On the substructure and dynamics of the circadian pacemakers underlying the wake-sleep cycle. *Studies of Brain Function*, vol. 3, Springer Verlag, Berlin.
- Glass, J.D., Lee, W., Shen, H. and Watanabe, M. (1994) Expression of immunoreactive polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology.* 60:87-95.
- Grimaldi, M., Pozzoli, G., Navarra, P., Preziosi, P., and Schettini, G. (1994) Vasoactive intestinal peptide and forskolin stimulate interleukin 6 production by rat cortical astrocytes in culture via a cytidil AMP-dependent, prostaglandin-independent mechanism. *J. Neurochemistry* 63:344-350.
- Grosse, J., Velickovic, A., Davis, F.C. (1995) Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Brain Res.* 686:10-16.
- Ding J.M., Chen D. Weber E.T., Faiman L.E., Rea, M.A. and Gillette, M.U. (1995) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713-1717.
- Green D.J., and Gillette R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198-200.
- Earnest D.J. and Sladek C.D. (1987) Circadian rhythms of vasopressin release from individual rat suprachiasmatic explants *in vitro*. *Brain Res.* 382, 129-133.
- Honma S., Shirakawa T., Honma K., and Hiroshige T. (1984) Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 114, 1791-1796.
- Honma, S., Katsuno, Y., Tanahashi, Y., Abe, H. and Honma, K. (1998) Circadian Rhythms of Arginine Vasopressin and Vasoactive Intestinal Polypeptide do not depend on Cytoarchitecture of Dispersed Cell Culture of Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Neuroscience* (in press)
- Inouye, S.T. and Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5962-5966.
- Jiang, Z.G., Yang, Y.Q., Allen, C.N. (1997) Tracer and electrical coupling of rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience.* 77:1059-1066.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P.,

- Steeves, T.D.L., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1997) Positive cloning of the mouse circadian *clock* gene. *Cell* 89:641-653.
- Lavialle, M. and Serviere, J. (1993) Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 4:1243-1246.
- Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M., Bittman, E.L. (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neuroscience* 7:1626-1638.
- Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H., Reppert, S.M. (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91:855-860.
- Moore, R.Y. and Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201-206.
- Morin, L.P., Johnson, R.F., and Moore, R.Y. (1989) Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci. Lett.* 99:55-60.
- Murakami, N., Takamura, M., Takahashi, K., Utsunomiya, K., Kuroda, H. and Etoh, T. (1991) Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res.* 545:347-350.
- Murphy, S. and Pears, B. (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience* 22:381-394.
- Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1986) A Functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. V. Pacemaker Structure, a clock for all seasons. *J. Comp. Physiol.*
- Reppert S.M., and Schwartz W.J. (1983) Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220, 969-971.
- Reppert S.M. and Uhl G.R. (1987) Vasopressin messenger ribonucleic acid in suprachiasmatic and supraoptic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinology* 120, 2483-2487.
- Richter, C.P. (1922) A behavioristic study of the activity of the rat. *Psychol. Monogr.* 1:1-55.
- Rietveld, W.J. (1984) The effect of partial lesion of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus on the circadian control of behaviour. *Ann. Rev. Chronopharmacol.* 1:1-4.
- Saitoh, Y., Nihonmatsu, I. and Kawamura, H. (1987) Transplantation of the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Acta Neurol. (Suppl.)* 41:41-45.
- Schwartz, W. J., Gross, R. A., and Morton, M. T. The suprachiasmatic nuclei contain an tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 1694-1698.
- Shen, H., Watanabe, M., Tomasiewicz, H., Rutishauser, U., Magnuson, T., and Glass, J.D. (1997) Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *Journal of Neuroscience*:17:5221-5229.
- Shibata S., Oomura Y., Kita H. and Hattori K. (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic

- nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247, 154-158.
- Shibata S., Moore R.Y. (1993) Tetrodotoxin does not affect circadian rhythms in neuronal activity and metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Brain Res.* 606, 259-266.
- Shinohara K., Honma S., Katsuno Y., Abe H. and Honma K. (1994) Circadian rhythms in the releases of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 170, 183-186.
- Shinohara K., Honma S., Katsuno Y., Abe H. and Honma K. (1995) Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus. *Proc.Natl.Acad .Sci .U.S.A.* 92, 7396-7400.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A., Lehman, M.N., (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813.
- Stephan F. and Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity are eliminated by suprachiasmatic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 54,1521-1527.
- Sollars, P.J., Pickerd,G.E. (1997) Vasoactive intestinal peptide efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in anterior hypothalamic transplants: correlation with functional restoration of circadian behavior. *Exp. Neurol.* 136:1-11.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 90:1003-1011.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389:512-516.
- Tominaga K., Inouye S.-I., and Okamura H. (1993) Organotypic slice culture of the rat suprachiasmatic nucleus: sustenance of cellular architecture and circadian rhythm. *Neuroscience* 58, 1025-1042.
- van den Pol A.N.(1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus or rat: intrinsic anatomy. *J.Comp.Neurol.* 191, 661-702.
- van den Pol, A.N. and Tsujimoto, K.L. (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neurosci* 15: 1049-1086.
- van den Pol A.N.(1991) The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. In: *Suprachiasmatic Nucleus, The Mind's Clock*. Eds. by Klein,D.C., Moore,R.Y.and Reppert,S.M. Oxford Univ.Press, New York,pp.17-50.
- Viswanathan, N., Weaver, D.R., Davis, F., Reppert, S.M., (1994) Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF 38393. *J. of Neuroscience.* 14:5393-5398.
- Vitaterna,M.H., King,D.P., Chang,A.-M., Kornhauser,J.M., Lowrey,P.L., McDonald,J.D., Dove,W.F., Pinto,L.H., Turek,F.W. and Takahashi,J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.

- Watanabe,K., Koibuchi,N., Ohtake,H. and Yamaoka, S. (1993) circadian rhythms of vasopressin release in primary cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 624:115-120.
- Welsh D.K., Diomedes E.L., Logothetis M.M., and Reppert S.M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Welsh D.K. and Reppert,S.M. (1996) Gap junction couples astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706:30-36.