

# 視交叉上核におけるソマトスタチンおよび VIP/PHImRNA の日周リズム

竹内 潤一

信州大学医学部精神医学教室

(主任: 吉松 和哉教授)

## Circadian Rhythm of Somatostatin and Vasoactive Intestinal Peptide/Peptide Histidine Isoleucine Messenger RNA Levels in Rat Suprachiasmatic Nucleus

Junichi TAKEUCHI

Department of Psychiatry, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Kazuya YOSHIMATSU)

Circadian profiles of somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine (VIP/PHI) messenger RNA levels in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of blinded rats were measured by Northern analysis using synthesized oligonucleotide probes; the SCN is the site of the circadian oscillator. Somatostatin mRNA level in the SCN showed a clear circadian rhythm with the peak at the onset of the subjective day and the trough at the onset of the subjective night. This rhythmicity was not observed in the adjacent anterior hypothalamus or the cortex, and was thus specific to the SCN. No significant circadian fluctuation was observed in VIP/PHI mRNA level in the SCN in this experiment. These results suggest functional differences among the neuropeptides in the SCN. *Shinshu Med. J.*, 39: 401-409, 1991

(Received for publication February 9, 1991)

---

**Key words:** circadian rhythm, suprachiasmatic nucleus, Northern analysis, somatostatin, VIP/PHI  
概日リズム, 視交叉上核, ノーザン解析, ソマトスタチン, VIP/PHI

---

### I 緒 言

単細胞生物から人間に至るまで、真核生物はあまねく日周リズムを持っていることが知られている。こうした日周リズムは周期がおよそ1日であることから概日リズム(サーカディアンリズム)と呼ばれ、生体に備わった固有の機能である。ヒトを含む哺乳動物においてはそのリズムの中核は脳の一部に局限されており、視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus, 以下SCN)に存在することが種々の方法で明らかにされている。たとえば、この核を破壊するとコルチゾール等の各種のホルモンのリズム、体温や摂食、睡眠

・活動パターンなどのリズムなどが消失し、また脳内の電気活動にもリズムが見られなくなる<sup>1)</sup>。一方、SCNを*in vivo*で脳の他の部分から外科的に切り離して孤立させた実験でも<sup>2)</sup>、*in vitro*でSCNを含む脳切片から記録された電気活動あるいはデオキシグルコース取り込み等にも、明確な概日リズムが存在することが確かめられており<sup>3)-5)</sup>、この核それ自体にリズムを発信する能力が存在することがわかっている。さらに画期的な実験として、SCN破壊によってリズムが消失した動物の脳内に、別の動物のSCN組織を移植することでリズムが再び復活することが示され<sup>6)</sup>、概日リズム中枢としてのSCNの働きが決定的に確立された。し

かし、高々24,000個の神経細胞からなるこの微小な核で、どのようにしてリズムが作り出され、また外界の光条件の変化に対応してゆくかについてはほとんど明らかにされていない<sup>7)</sup>。これに関してSCNには様々な神経伝達物質やその受容体が存在することが調べられており、とりわけ多くの神経ペプチドが合成されることが判っている<sup>8)9)</sup>。神経ペプチドは神経伝達調節物質(=neuromodulator)としての側面を持ち、比較的長時間の神経活動を制御する働きを持つことが知られており、SCNにおける概日リズム生成との関係が注目されている。

たとえば、バソプレッシン(arginine vasopressin, 以下AVP)の濃度はSCNにおいて明期に高く暗期に低く、そのmRNA量もこれに対応して明期に高く暗期に低いパターンを持つことが示されている<sup>10)11)</sup>。

Vasoactive intestinal peptideおよびpeptide histidine isoleucine (VIP, PHI)は同一の遺伝子上にコードされ、ほぼ同時に産生されることが知られている。双方はSCNに強く局在し、またVIPペプチドの量およびそのmRNA (VIP/PHI mRNA)量には、明暗条件下で、AVPとは逆に明期に低く暗期に高いパターンを持つことが示されている<sup>12)14)</sup>。しかしこの昼夜差が恒明あるいは恒暗条件の下でも見られるか否かは未だ解っていない。

他にSCNに多く存在するペプチドのうち、ソマトスタチンについてはそのリズムの有無は確認されておらず、mRNA量の昼夜差についても調べられていない。ソマトスタチンは中枢に限らず末梢においてもVIPを含む他の幾つかのペプチドホルモンに対し抑制的な支配をすることが知られており、またごく最近このペプチドの遺伝子の転写を調節する特異的な塩基配列が同定され、リズム生成と遺伝子発現との関わりを考えてゆく上でも大変興味深い。

そこで今回、ソマトスタチンおよびVIP/PHImRNAに対する合成オリゴヌクレオチドプローブを使用して、4時間ごとに1日6時点においてそれぞれのmRNA量のSCNにおける日周変動を調べ、概日リズム生成との関わりを検討した。

## II 研究材料および方法

### A 実験動物および組織の調製

Wistar系雄性ラット3週齢を実験動物として用い(1回の実験に24~36匹)、12時間:12時間の明暗条件(9:00~21:00明期, 21:00~9:00暗期)にて

2週間飼育した後、エーテル麻酔下で盲目とし、さらに2日間飼育した動物から4時間ごとに脳を取り出した。脳は前額断にて約1mmの厚さのスライスとし、ドライアイスにて冷却したシリコンプレート上で直ちに、SCN、視床下部前部(anterior hypothalamus; AH)および大脳皮質(cerebral cortex; CX)をメスにて切り出し、液体窒素中につけたシリコンチューブ内で急冷し、-80°Cにて保存した。

### B RNAの抽出

組織よりの全RNAの抽出は、Whiteら<sup>15)</sup>の方法に準じて行った。各組織は、7Mの尿素を含む抽出バッファー(7M urea, 10mM Tris HCl, 1mMEDTA, 0.35M NaCl, 2% sodium dodecyl sulfate (=SDS), pH 8.0) 500 $\mu$ lとともにポリトロンにてホモジェナイズし、フェノール溶液(phenol/chloroform/isoamylalcohol, 50/48/2, v/v/v)を同量加え、3~4回抽出した後、クロロフォルム溶液(chloroform/isoamylalcohol, 96/4, v/v)にて抽出し、3倍量の100%エタノールを加え、一昼夜、-20°Cに放置しRNAを沈澱させた。得られた全RNAは、水に溶解し260nmの吸光度を計測して定量した。

### C プローブの調製

プローブとして、すでに報告されているラット preprosomatostatin gene<sup>16)</sup>(全長590base)およびVIP/PHI gene<sup>17)</sup>(全長1,700base)よりおのおのコード領域を選び、42塩基(5' GGA TGT GAA TGT CTT CCA GAA GAA GTT CTT CCA GCC AGC TTT GCG 3')および45塩基(5' GTC GCT GGT GAA AAC TCC ATC AGC ATG CCT GGC ATT TCT GGA 3')のオリゴヌクレオチドプローブをモデル380A DNAシンセサイザー(Applied Biosystems, Inc.)にて合成した。各プローブはポリアクリルアミドゲルにて精製し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP (6,000 Ci/mM)を用い、terminal deoxynucleotidyl transferase 15 unitsによって3'末端にラベルしたものをを用いた<sup>18)</sup>。

### D ノーザン解析

ノーザン解析は、Sambrookら<sup>19)</sup>の方法に基づき若干の変更を加えて行った。4~6匹の動物の組織から得られた15~30 $\mu$ gの全RNAを、ホルムアルデヒド(最終6%)およびホルムアミド(最終50%)を含むバッファー中で、65°C10分間変性させた後、ホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動されたRNAは、ニトロセルロースフィルターにて20 $\times$ SSC(1 $\times$ SSC=0.15M NaCl, 0.015M

sodium citrate) 中で1晩プロットした後、真空乾燥器中で80°C 2時間固定を行った。プロットされたフィルターは、プレハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC, 7×Denhardt's solution, 3mM glycine, 0.1% sarcosine, 50mM Tris-HCl pH7.0, salmon sperm DNA 100 $\mu$ g/ml, yeast tRNA 25 $\mu$ g/ml, 10mM EDTA, polyadenosine (polyA) 0.1mg/ml) 中にて65°C, 2時間インキュベーションした。その後、前記バッファーにさらに5 $\mu$ g/ml の poly dA (12-18 mers of deoxyadenosine) およびラベルされたプローブ (1.5-3.0 $\times 10^6$  cpm/ $\mu$ l) 30~40 $\mu$ l を加えたハイブリダイゼーションバッファー中で12~18時間、60°Cにてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズされたフィルターは0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む6×SSC バッファーにて65°C 1時間、3×SSCにてさらに65°C 1時間の洗浄を加え非特異的結合を除いた。

#### E プロットの定量および解析

ハイブリダイズされ適当な条件で洗浄を受けたフィルターは、イメージングプレートに1~2時間露光した。放射線量は、photo-stimulated luminescence (PSL) として、イメージアナライザー (BAS 2000, Fuji Film Inc.) によって検出、定量、解析した。定

量、解析の終わったフィルターは、70°Cにて0.1% SDS を含む 0.2×SSC 溶液中で2時間の洗浄を行い、プローブを取り除いた後、別のプローブにてハイブリダイズするために保存した。

### III 結 果

#### A イメージアナライザーによる定量の評価

まず、今回の実験の定量に用いたイメージングプレートによる放射線量の測定について、従来のシンチレーションカウンターとの比較を行ったところ、photo-stimulated luminescence (PSL) とシンチレーションカウンターによる読み counts per minute (cpm) の間には、今回の実験に使用された範囲内においても非常に正確な直線性が認められた (Fig. 1)。

#### B ソマトスタチン mRNA 量の日周変動

ソマトスタチン mRNA に対するプローブにてノーザン解析を行った具体例を Fig. 2 に示した。このプローブによって単一のバンドが認識され、その大きさは報告されている preprosomatostatin gene の cDNA の長さ590塩基 (base) に近いことから、ソマトスタチン mRNA に特異的なバンドであることが確認された。

データは各レーンに現れたバンドの PSL を、それ

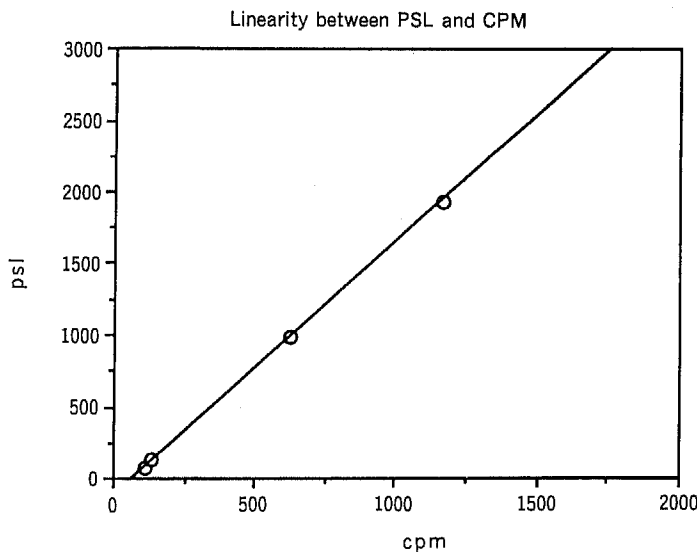


Fig. 1 Linear relationship between the quantification with the Image Analyzer (BAS 2000, Fuji Film) and counts from scintillation spectrometer. PSL; photo-stimulated luminescence CPM; counts per minute

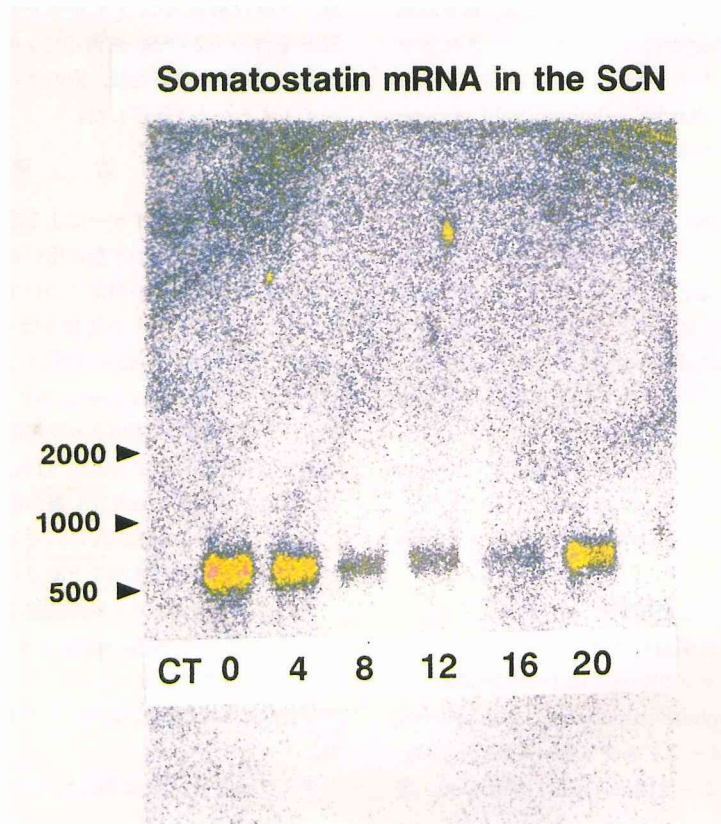


Fig. 2 Imaging plate autoradiography of somatostatin mRNA extracted from 4 bilateral SCNs. After entrainment to a 12 hr; 12 hr light-dark cycle, rats were blinded by orbital enucleation 2 days before sacrifice. The SCN were removed at 4-hour intervals throughout the day. The circadian time (CT) of sacrifice is shown on each lane. The total RNA loaded on each lane is CT0, 24 $\mu$ g; CT4, 24 $\mu$ g; CT8, 22 $\mu$ g; CT12, 22 $\mu$ g; CT16, 15 $\mu$ g; CT20, 27 $\mu$ g. Arrows indicate the size of RNA (bases).

それぞれのレーンごとに流した全RNA量で除した相対値として定量した。Fig. 3に4回行った実験の結果をまとめた。各実験ごとに比較を可能とするため、各シリーズ (Fig. 3aにそれぞれ違った模様のコラムで示した。同シリーズのデータは同じ模様とした) の平均値を1とし、それに対する比として標準化した。Fig. 3bは4シリーズのデータを統計処理したものである。これより、盲目にされ、外界の光の影響を受けないラットのSCNにおいて、ソマトスタチン mRNA量が夜明け付近、すなわちCT0 (CT=circadian time=サーカディアン時間; ここでCT0とは明期の始まり、

CT12は暗期の始まりを示す) 付近に最大となり、夜の始まりすなわちCT12付近に最小値を持つ日周性を持つことが明らかになった。特に、そのmRNA量の最大値と最小値には約2~3倍の違いが見られることがわかった。同様な実験を視床部前部 (anterior hypothalamus=AH) および大脳皮質 (cerebral cortex=CX) について行ったが、AH (Fig. 4) においてもCX (データ省略) においても、SCNに見られた日内変動は観察されなかった。

#### C VIP/PHI mRNA量の変化

ソマトスタチン mRNAを検出、定量した同一フィ

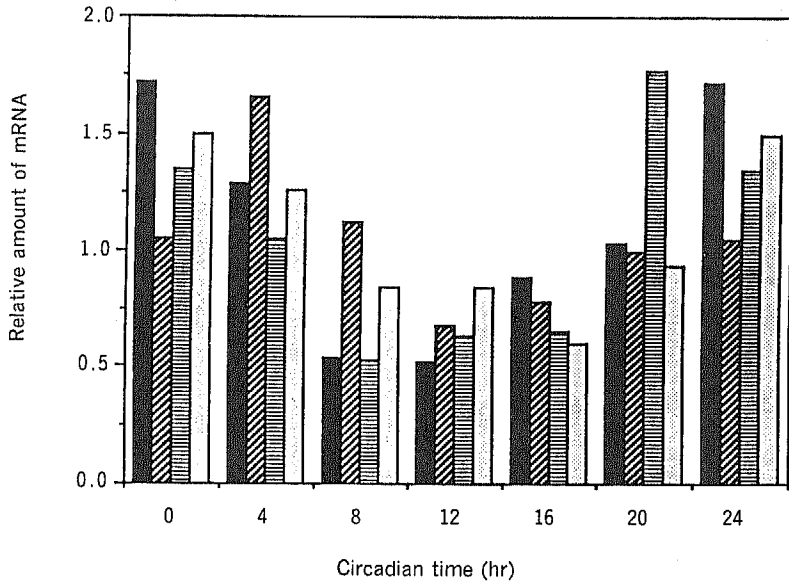


Fig. 3a Circadian variation of somatostatin mRNA levels in the SCN. Quantification of 4 series of data. Each column represents the radioactivity divided by the estimate of loaded total RNA by the optical density at 260 nm. Mean level of each series of data is standardized to 1. Values at CT24 are reproductions of CT 0.

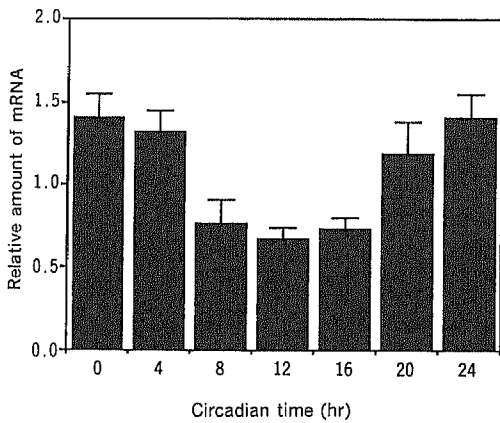


Fig. 3b Summarized result of 4 series of data shown in Fig. 3a as mean values with standard errors.

ルターを用いVIP/PHIのプロープにて解析を行ったところ、約2,000塩基の単一バンドが検出された。これは報告されているVIP/PHI geneのcDNAの長さ<sup>12)</sup>に近く、VIP/PHI mRNAに特異的なバンドであることが確認された。定量を前述の方法にて行ったところ、盲目にされ、外界の光の影響を受けないラットのSCNにおいては、1日いずれの時間においてもVIP/PHI mRNAの量はほぼ一定であることがわかった (Fig. 5)。

またAHにおいては、明らかなバンドは検出されずVIP/PHI mRNAは合成されていないか、合成されていてもこの実験方法にては検出できないほど微量であることが確認された。

#### IV 考 察

哺乳動物における概日リズムの中枢と考えられているSCNについて、そのリズム生成とそこに存在する神経ペプチドの働きとを結びつけて考えることが検討されている。今回の実験では盲目にしたラットの

Somatostatin mRNA in the anterior hypothalamus (AH)

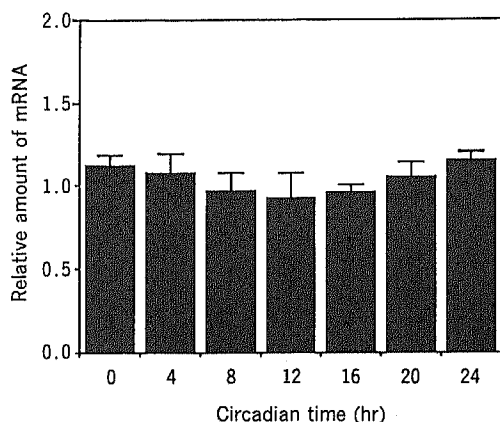


Fig. 4 Absence of significant circadian variation in somatostatin mRNA levels in the anterior hypothalamus (AH) just dorsal to the SCN. Three series of data are summarized. Mean level of each series of data is standardized to 1.

VIP/PHI mRNA in the SCN

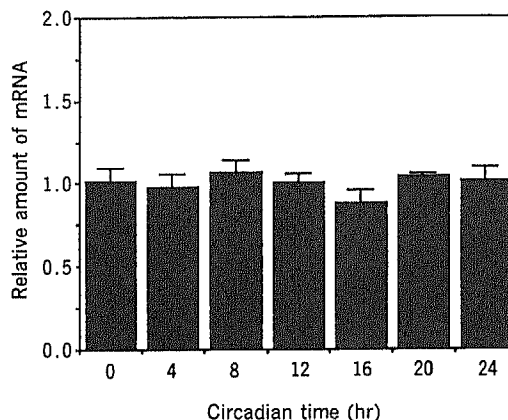


Fig. 5 Absence of significant circadian variation in VIP/PHT mRNA levels in the SCN. After entrainment to a 12hr: 12hr light-dark cycle, rats were blinded by orbital enucleation 2 days before sacrifice. The SCNs were removed at 4hour intervals throughout the day. Three series of data are summarized as mean values with standard errors. Mean level of each series of data is standardized to 1.

SCNにおいて、そこに存在するペプチドの1つソマトスタチンのmRNAに明らかに概日リズムが認められる一方、同じくSCNに局在するVIP/PHIのmRNA量には変動が認められないことが初めて示された。また、今回著者が使用したイメージングプレートによる放射線量の測定が正確かつ簡便であることも明らかとなった。

従来、特異的蛋白や核酸量の測定にはX線フィルムを用いたオートラジオグラムをデントメリーにて定量する方法が一般的であった。しかし、従来の方法の問題点として、X線フィルムの感光度と実際の放射線量との関係はS字カーブ状で、濃度が低いと感度が悪く、濃度が高いと飽和に達してしまい、直線区間を除いては十分なS/N比が得られないことが問題となっていた。液体シンチレーション法を使うとこの点は解消されるが、非常に繁雑であり、また一度特定のプローブでハイブリダイズしたものを別のプローブで再ハイブリダイズすることは不可能であった。今回著者が使用した方法は、オートラジオグラフィーと液体シンチレーションの双方の利点を持ち、さらに比較的短時間で簡便に結果を得られることが判明し、このシステ

ムが脳の微小な核における核酸の量を調べる上でも有用であることを示した点でも意義をもつと考える。

免疫組織化学的方法および *in situ* hybridization 法により、VIP/PHI mRNAは視床下部およびその周辺においてはほぼSCNにのみ限局して存在することが確かめられているのに対し、ソマトスタチンmRNAはSCN付近の第3脳室周辺にも存在することがわかっている<sup>9)</sup>。今回コントロールとして調べた anterior hypothalamus (AH) がこの組織を反映しているが、結果に示した様にAHでは1日を通して明確なリズムは見られず、またcortex (CX)にも変化は見られなかった。このことからソマトスタチンmRNA量の変化はSCNに特異的であることが強く示唆された。

今回示されたソマトスタチンmRNA量の変動のリズムについて興味深いことの1つは、リズムの位相が従来報告されているSCNにおける電気活動や代謝活動の日周リズムに比して<sup>24)</sup>約6時間先行していることである。すなわち、後2者の最大値、最小値は、それぞれ主観的明期(外界の明暗情報が遮断されている場合その動物の体内時計にとって昼にあたる期間)および暗期(同様に夜にあたる期間)の midpoint 付近であるの

に対し、ソマトスタチン mRNA 量の最大値は、主観的明期の始め付近、また最小値は暗期の始め付近となっている。

ごく最近、SCN におけるソマトスタチンペプチドの量が酵素抗体法によって測定され (Shinohara ら, 1991, 投稿中), これが mRNA の変動に近い形を示し、かつそれによりやや位相の遅れた日周リズムを持つことが示されている。このことから SCN におけるリズム生成の 1 つの可能性として、ソマトスタチン等の神経ペプチドの mRNA 量の変化が神経ペプチド量の変化をもたらす、この神経ペプチドが SCN の電気的活動を調節しているということが考えられる。

著者の実験で、SCN の VIP/PHI mRNA 量が一定であることを示したのに対し、Albers ら<sup>19)</sup>は VIP/PHI の mRNA 量が明期と暗期で異なり、明期に少なく暗期に多い昼夜差を示すことを報告している。しかし、この食い違いは、実験条件の違いから生じたものであると考えられる。すなわち、今回の実験は動物を盲目にすることで全暗黒条件下に置き、外界の光を遮断して行ったのに対し、Albers らは動物を明暗サイクルの下に置き外界の光の影響を受けたまま行っている点で大きな違いがある。また SCN において、外界からの光の情報を網膜から伝える線維が豊富な領域 VIP/PHI およびその mRNA が局在することがわかっていることから、VIP/PHI mRNA は外界の光情報がない場合一定レベルに保たれるが、光情報に反応してその量が増減するものと解釈される。

Uhl と Reppert<sup>10)</sup>によって示された様に、AVP (arginine vasopressin) の mRNA 量にも、盲目にした動物の SCN において昼夜差が認められる。これが外界の光情報なしでも存続することから、内因性のリズムを持つものと考えられており、今回著者が示したソマトスタチン mRNA との類似性が認められる。SCN は組織学的に大きく 2 つの領域、すなわち背内側 (dorsomedial=DM) 領域と腹外側 (ventrolateral=VL) 領域に分けて考えられることがしばしばあるが、興味深いことにこの AVP とソマトスタチンの 2 つのペプチドはともに SCN において、DM 領域に存在することがわかっている<sup>20)</sup>。一方、内因性的変化は認められないが、明暗条件に反応する形でリズムが見られる VIP/PHI mRNA は、SCN において VL 領域に存在し、先にも述べたごとくこの領域には網膜からの投射線維がここに終わることがわかっている<sup>20)</sup>。これらのことより、SCN に存在するペプチドの働き

と、その解剖学的領域とを結び付けて考えることは非常に興味深い。すなわち、SCN の DM 領域に存在するペプチドは内因性的リズム生成に関係し、その mRNA は概日リズムをもって合成される。一方 SCN の VL 領域に存在するペプチドは、外界の明暗情報を伝える働きを持ち、明暗条件に応じてその mRNA の合成量は調節されているという仮説を立てることができる。これを確かめるためには SCN に存在する他のペプチド、たとえば、angiotensin II (DM 領域に存在する)、bombesin あるいは gastrin releasing peptide, GRP (VL 領域に存在する)、corticotropin releasing hormone, CRH (両領域に存在する) などの挙動を調べてゆく必要がある。また、ソマトスタチンを含めたペプチド類について、アゴニストやアンタゴニストを外から加えることで、動物の行動リズム等にどのような影響が見られるかを検討してゆくことも必要であると考えられる。

mRNA の量は、一般に遺伝子からの転写速度とその分解速度の平衡によって決まると考えられているため、今回観察された mRNA 量の変動を惹起する機序および、内因性的計時機構との関係は複雑であることが予想される。ソマトスタチン遺伝子については、最近、サイクリック AMP (cAMP) を介してその転写を調節する特別な塩基配列がプロモーター領域に発見され、さらに、その配列に特異的に結合する核蛋白も同定されている<sup>21)22)</sup>。今回の実験で観察されたソマトスタチン mRNA 量の変化も、これらの調節機構と何らかの関係を持つ可能性も考えられ、今後検討してゆくべき課題である。

## V 結 語

ラット視交叉上核 (SCN) において、ソマトスタチンおよび VIP/PHI の mRNA 量の日周変化を検討した。外界の光情報を遮断された動物でもソマトスタチン mRNA 量には明らかな概日リズムが見られたが、VIP/PHI mRNA 量は一定に保たれていた。またソマトスタチン mRNA の概日リズムの位相は SCN の電気活動に先行した形を持っていた。これらの結果は、ソマトスタチン mRNA の合成が SCN における内因性的概日リズム生成あるいは伝達に深く関わっている可能性を示唆している。

本稿の要旨は、平成 2 年 9 月、第 17 回国際精神・神経薬理学会総会および、平成 2 年 10 月、第 33 回日本神

経化学会総会で発表した。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました、  
吉松和哉教授に深甚なる謝意を表します。また、御教

示、御指導下さいました三菱化成生命科学研究所、井  
上慎一先生に深く感謝します。

#### 文 献

- 1) Meijer, J. H. and Rietveld, W. J.: Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69: 671-707, 1989
- 2) Inouye, S. T. and Kawamura, H.: Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic 'island' containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5962-5966, 1979
- 3) Inouye, S. T. and Kawamura, H.: Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol*, 146: 153-160, 1982
- 4) Schwartz, W. J. and Gainer, H.: Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*, 197: 1089-1091, 1977
- 5) Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. and Hattori, K.: Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res*, 247: 154-158, 1982
- 6) Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Menaker, M.: Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978, 1990
- 7) Rusak, B. and Bina, K. G.: Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci*, 13: 387-401, 1990
- 8) van den Pol, A. N. and Tsujimoto, K. L.: Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*, 15: 1049-1086, 1985
- 9) Card, T. P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I. and Baldino, F.: Localization of vasopressin, vasoactive intestinal peptide, peptide histidine isoleucine and somatostatin mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res*, 252: 307-315, 1988
- 10) Uhl, C. R. and Reppert, S. M.: Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and brattleboro rats. *Science*, 232: 390-393, 1986
- 11) Burbback, T. P. H., Liu, B., Voorhuis, T. P. M. and van Tol, H. H. M.: Diurnal variation in vasopressin and oxytocin messenger RNAs in hypothalamic nuclei of the rat. *Mol Brain Res*, 4: 157-160, 1988
- 12) Albers, H. E., Minamitani, N., Stopa, E. and Ferris, C. F.: Light selectively alters vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine immunoreactivity within the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 437: 189-192, 1987
- 13) Albers, H. E., Stopa, E. G., Zoeller, R. T., Kauer, J. S., King, J. C., Fink, J. S., Movtaker, H. and Wolfe, H.: Day-night variation in preprovasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine mRNA within the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res*, 7: 85-89, 1990
- 14) Takahashi, Y., Okamura, H., Yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S. and Ibata, Y.: Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res*, 497: 374-377, 1989
- 15) White, J. D., Stewart, K. D. and McKelvy, J. F.: Measurement of neuroendocrine peptide mRNA in discrete brain regions. In: Conn, D. M. (ed.), *Neuroendocrine peptide methodology*, pp. 67-78, Academic Press, San Diego, 1989
- 16) Montminy, M. R., Goodman, R. H., Horovitch, S. J. and Habener, J. F.: Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 3337-3340, 1984
- 17) Nishizawa, M., Hayakawa, Y., Yanaihara, N. and Okamoto, H.: Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. *FEBS Lett*, 183: 55-59,



1985

- 18) Eschenfeldt, W. H., Puskas, R. S. and Berger, S. L.: Homopolymeric tailing. In: Berger, S. L. and Kimmel, A. R. (eds.), *Methods in enzymology*, vol. 152, pp. 337-342, Academic press, San Diego, 1987
- 19) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: *Analysis of RNA: Molecular cloning*, 2nd ed., pp. 7.37-7.55, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- 20) Okamura, H., Takahashi, Y., Terubayashi, H., Hamada, S., Yanaihara, N. and Ibata, Y.: VIP/like immunoreactive neurons and retinal projectinos in the rat suprachiasmatic nucleus. *Biomedical Res*, 8: 253-262, 1987
- 21) Montminy, M. R., Sevario, K. A., Wagner, J. A., Mendel, G. and Goodman, R. H.: Identification of a cyclic-AMP responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 6682-6686, 1986
- 22) Montminy, M. R. and Bilazikjian, L. M.: Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328: 175-178, 1987

(3. 2. 9 受稿)

---