

新規の牛乳による入眠促進機構の解明とその入眠促進因子の単離

神戸大学大学院農学研究科 長谷川 信

1. 要 約

我々は、これまでに牛乳に含まれる α -ラクトアルブミンがグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の遺伝子発現を促進すること、及び、GLP-1 が中枢神経系においてノルアドレナリンの合成或いは放出の促進により睡眠を誘導することを示唆している。本研究では、牛乳による入眠促進機構の解明を目的として、GLP-1 が関与する入眠促進機構の解明と、 α -ラクトアルブミンから産生される入眠促進ペプチドの検索を行なうこととした。

鶏への GLP-1 の脳室内投与は、中枢神経系において最上流の摂食抑制ペプチドである α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) の前駆体プロオピオメラノコルチン (POMC)、及び、その下流の摂食抑制ペプチドである副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の mRNA 量を有意に増加させた。ここで、CRF の中枢投与は入眠を誘導しないこと、及び、POMC から α -、 β -、 γ -MSH 及び β エンドルフィンの 4 種のペプチドが産生されることが知られていることから、これらの 4 種のペプチドのいずれかを介して GLP-1 による入眠促進が発現される可能性が推察された。そこで、哺乳類において摂食抑制作用を有することが確認されている 3 種の MSH (α -、 β -、 γ -) を鶏に中枢投与した結果、 α -MSH のみが強力に摂食を抑制し、且つ入眠を促進することが明らかとなった。

α -ラクトアルブミン酵素分解物の経口投与は、鶏の小腸遠位部における GLP-1 の前駆体プレプログルカゴンの mRNA 量を有意に増加させた。又、 α -ラクトアルブミン酵素分解物は初代培養小腸細胞のプレプログルカゴン mRNA 量を有意に増加させた。これらの結果から、 α -ラクトアルブミン酵素分解物中にプレプログルカゴンの遺伝子発現を促すペプチドが存在し、上述の初代培養小腸細胞による GLP-1 発現 *in vitro* の検索系を用いれば、 α -ラクトアルブミン酵素分解物中の入眠促進因子を特定できる可能性が示された。

キーワード GLP-1、MSH、CRF、 α -ラクトアルブミン酵素分解物、ペプチド、培養細胞

2. 緒 言

我が国においては、国民の約 2 割が睡眠による休養が不十分であると感じており、又、1984 年から 1993 年にかけて、睡眠障害による外来推計患者数は約 2.3 倍に増加している (Yamadera, 2001)。ここで、睡眠障害とは睡眠と覚醒に関連する多様な疾患の総てを指すが、昼夜を問わず経済活動を営む先進諸国においては、夜間勤務者の増加、夜間帯に活動する若者の増加、或いは海外渡航者の増加等が今後も避け得ないことから、このような睡眠障害者は増加の一途を辿ることになると予想される。加えて、年齢を重ねるに伴い、睡眠時刻のずれ、深いノンレム睡眠の減少、

中途覚醒の増加による睡眠の分断化等が起こることから、高齢化社会を迎えつつある我が国においては、睡眠障害の解消は益々重要な課題になると考えられる。

ところで、脳の松果体は、環境の明暗サイクルに体内機能を同調させる機能を果たしており、この松果体で産生されるメラトニンは、その合成と分泌が暗期に高まり明期に低値に維持されることから、明暗サイクルの一つである概日リズムの最も安定したマーカーとして位置付けられている。ここで、この概日リズムの乱れを修正する為には1週間以上の期間が必要とされるが、不規則な夜間勤務を行なう看護師等の場合には概日リズムの乱れを修正することは不可能であること、及び、高齢者における睡眠障害は入眠前の血中メラトニン濃度の上昇時刻のずれと睡眠中の血中メラトニン濃度のピーク値低下に基づくこと等が知られていることから、必要な時刻に入眠する為の手段の一つとして、欧米では、医薬品或いは食品としてのメラトニンの利用が認められている。しかし、日本では、メラトニンは医薬品として認可されておらず、又、食品として使用することもできない（薬事法上、医薬品成分と見做されていることに拠る）。そこで、我が国では、メラトニンの前駆物質であるセロトニンの脳内含有量を高めることにより入眠を促進するべく、セロトニン合成の原料となるトリプトファン或いはトリプトファンを多く含む食品の摂取が推奨されている。実際、食餌へのトリプトファン添加により、脳内セロトニン濃度が上昇し、入眠時間が短縮すること（Sarwar *et al.*, 1999）が確認されている。又、古くから牛乳の入眠促進効果が知られており、その機構の一つとして、乳清タンパク質の一つである α -ラクトアルブミンによる血中トリプトファン濃度上昇とそれに基づく入眠の促進（Markus *et al.*, 2000；Minet-Ringuet *et al.*, 2004）が報告されている。これらのことから、牛乳による入眠促進機構の1つとして、血中トリプトファン濃度の上昇に基づく脳内セロトニン含量の増加（以下、トリプトファン-セロトニン系と称す）が示唆されている。

我々は、鶏の摂食調節機構解明を目的とした一連の研究において、消化管ホルモンの一つであるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1、ラットでは小腸L細胞で産生）の摂食抑制作用が入眠促進に基づくものであること（Bungo *et al.*, 1999）、そして、GLP-1の中枢投与は、視床下部においてセロトニン含量に影響することなくノルアドレナリンの合成或いは分泌を促進すること（Tachibana *et al.*, 2002）、及び、ノルアドレナリンの前駆物質であるドーパミンのノルアドレナリンへの変換酵素であるドーパミン β -ヒドロキシラーゼを阻害することによりGLP-1の入眠促進効果が緩和されること（Bungo *et al.*, 2001）を見出したことからGLP-1の入眠促進作用の発現にはセロトニンではなくノルアドレナリンが関与していることを示唆した。加えて、GLP-1による入眠促進に食餌タンパク質の相違が影響を及ぼすこと（Honda *et al.*, 2000）を示した。最近、ヒトに関して、乳清タンパク質の摂取が血漿GLP-1濃度の上昇を引き起こして食欲を減退させること（Hall *et al.*, 2003）が報告されたが、このことと我々による此れ迄の研究成果を考え合わせると、トリプトファン-セロトニン系とは異なる“もう一つの牛乳による入眠促進機構”が存在し、その機構に、牛乳に含まれる未知の因子による消化管からのGLP-1分泌促進と、それに基づく視床下部ノルアドレ

ナリンの合成或いは放出の促進（以下、GLP-1-ノルアドレナリン系と称す）が関与している可能性が極めて高いと判断された。

ここで、現在のところはマウスやラットを用いて睡眠関連実験が行なわれているが、これらの実験動物はヒトと異なり、血中メラトニン濃度が低下する明期に睡眠をとることから、その結果を直接ヒトに反映させることについて疑問が残されている。しかし、これらの実験動物に対して鶏は、ヒトと同様、暗期に睡眠をとること、鶏の松果体は光（明暗の入力情報）に対する感受性が高くメラトニン産生試験等に頻繁に利用されていること（Nagy *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2003; Sanada *et al.*, 2000）、及び、GLP-1 の脳室内投与による入眠促進効果はラットにおいては認められないこと（McMahon *et al.*, 1998）から、ヒトのモデル動物として鶏を用いれば、トリプトファン-セロトニン系以外の系、即ち、GLP-1-ノルアドレナリン系を介した新たな入眠促進機構の存在を明らかにできると共に、牛乳中の入眠促進因子を分離・同定できると判断された。

そこで、本研究では、鶏を用いて、GLP-1 が関与するノルアドレナリンを介した中枢入眠促進機構を明らかにすると共に、牛乳中の入眠促進因子を単離することを目的とした。

3. 材料及び方法

(1) GLP-1 による入眠促進機構の解明

1) GLP-1 の中枢投与が視床下部神経ペプチドの発現に及ぼす影響

3時間絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛に、0.1% エバンスブルーを含む生理食塩水（対照）或いは33pmolのGLP-1を側脳室内投与し、投与2時間後に断頭により屠殺し、側脳室内がエバンスブルーにより染まっている個体から視床下部を摘出した。液体窒素で速やかに凍結後、RNA抽出まで-80℃で保存した。セパゾールRNAI（ナカライテスク株式会社）を用いて視床下部及び延髄から抽出した総RNAを、SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン株式会社）を用いてcDNAに変換した。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR systemを用いたリアルタイムPCRにより、GLP-1による摂食抑制に関与するとされる神経ペプチド群である視床下部プロオピオメラノコルチン（POMC）、副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）、及び、延髄のPOMCのmRNA量を、それぞれのmRNAに特異的なプライマー（POMC sense, 5'-AGA TGG AGA AGG GTT GGA A-3'; POMC antisense, 5'-CGT TGG GGT ACA CCT TGA-3'; CRF sense, 5'-CTC CCT GGA CCT GAC TTT-3'; CRF antisense, 5'-CCT CAC TTC CCG ATG ATT-3'）及び内部標準として18SリボソームRNAに特異的なプライマー（sense, 5'-AGT CCC TGC CCT TTG TACA-3'; antisense, 5'-CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG-3'）を用いて解析した。

2) POMC由来神経ペプチドの中枢投与が鶏の摂食量に及ぼす影響

3時間絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛に、0.1% エバンスブルーを含む生理食塩水（対照）、40 or 400 pmolのメラニン細胞刺激ホルモン（ α -、 β -及び γ -MSH）を側脳室内投与

し、投与後2時間に渡り、摂食量及び入眠促進行動に及ぼす影響を調べた。投与2時間後に断頭により屠殺し、側脳室内がエバンスブルーにより染まっている個体のデータのみを採用した。

(2) 牛乳に含まれる入眠促進因子の検索

1) α -ラクトアルブミン酵素分解物の経口投与が小腸プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

16時間絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛に、3mlの33%カゼイン酵素分解物水溶液或いは33% α -ラクトアルブミン酵素分解物水溶液を経口投与し、投与4時間後に小腸遠位部を摘出した。生理的食塩水を用いて小腸内腔を洗浄後、速やかに液体窒素を用いて凍結し、RNA抽出まで-80°Cで保存した。凍結小腸遠位部を粉碎後、セパゾールRNAI（ナカライテスク株式会社）を用いて総RNAを抽出し、得られたRNAをSuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン株式会社）を用いてcDNAに変換した。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR systemを用いたリアルタイムPCRにより、GLP-1の前駆体であるプレプログルカゴンのmRNA量を、プレプログルカゴンmRNAに特異的なプライマー（sense, 5'-CGA GAG TTC ATT ACG TTA AAG GTT-3'; antisense, 5'-TGT AGG TGC CTT CAG CAT GTC T-3'）及び内部標準として18SリボソームRNAに特異的なプライマー（sense, 5'-AGT CCC TGC CCT TTG TAC ACA-3'; antisense, 5'-CCT CAC TAA ACC ATC CAA TCG-3'）を用いて解析した。

2) α -ラクトアルブミン酵素分解物が初代培養小腸細胞プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

16時間絶食した8日齢の白色レグホーン種雄雛の小腸遠位部を摘出し、生理食塩水により小腸内腔を洗浄し、メスを用いてリン酸緩衝液中で小腸内腔から小腸上皮の細胞のみを分離した。室温で2分間静置し、浮遊する細胞を含む上澄み液を遠心管に移した後、遠心分離（1,000rpm、5分間）により細胞を回収した。得られた沈殿をF-12培地に懸濁し、遠心分離（1,000rpm、5分間）により細胞を回収した。この操作を合計3回繰り返した。ラクトアルブミン酵素分解物を含むF-12培地で37°Cで3時間培養し、遠心分離（1,000rpm、5分間）した後、得られた沈殿をリン酸緩衝液で懸濁する。再び、遠心分離（1,000rpm、5分間）した後、得られた沈殿からセパゾールRNAIを用いてRNAを抽出し、得られたRNAをSuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン株式会社）を用いてcDNAに変換した。そして、3. - (2) - 1)と同様の方法で、プレプログルカゴンのmRNA量を解析した。

3) α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画

α -ラクトアルブミン酵素分解物の逆相カラムクロマトグラフィーを用いて得られた3つのピークを基に化学合成された3種類のペプチドについて、上述2)の初代培養小腸細胞の*in vitro*評価系を用いたGLP-1の発現促進並びに入眠促進の両効果を検討したが有効な効果は得られなかったことから、未だ単一にまで精製されていないことが推察された。そこで、改めて、 α -ラクトアルブミン酵素分解物を1mg/mlの濃度で20mMリン酸緩衝液（pH6.5）に溶解してゲルろ過カラム（Protein-Pak 125、日本ウォーターズ株式会社）に注入し、分画後の溶出液を注入5分

後から 20 分後までの主要ピークを分取した。

4. 結果及び考察

(1) GLP-1 による入眠促進機構の解明

1) GLP-1 の中枢投与が視床下部神経ペプチドの発現に及ぼす影響

GLP-1 の中枢投与は視床下部 POMC 及び CRF の mRNA 量を有意に増加させた (図 1)。我々は、 α -MSH の中枢投与が視床下部 CRF mRNA 量を増加させることを (Honda *et al.*, 2007)、また、Tachibana らは、 α -MSH の摂食抑制効果は CRF 受容体のアンタゴニストの投与により緩和されること (Tachibana *et al.*, 2007)、及び、GLP-1 の摂食抑制効果は CRF 受容体のアンタゴニストの投与により緩和されること (Tachibana *et al.*, 2006) を、それぞれ報告している。これらの報告と本研究の結果から、GLP-1 の摂食抑制効果は POMC ニューロンを介した CRF の刺激によることが示唆された。ここで、CRF の中枢投与は運動量を増加させるが (Zhang *et al.*, 2001)、この運動量の増加はノルアドレナリンの共投与により消失して入眠が誘導されること (Zhang *et al.*, 2003) が報告されている。我々は、GLP-1 の中枢投与は、視床下部においてノルアドレナ

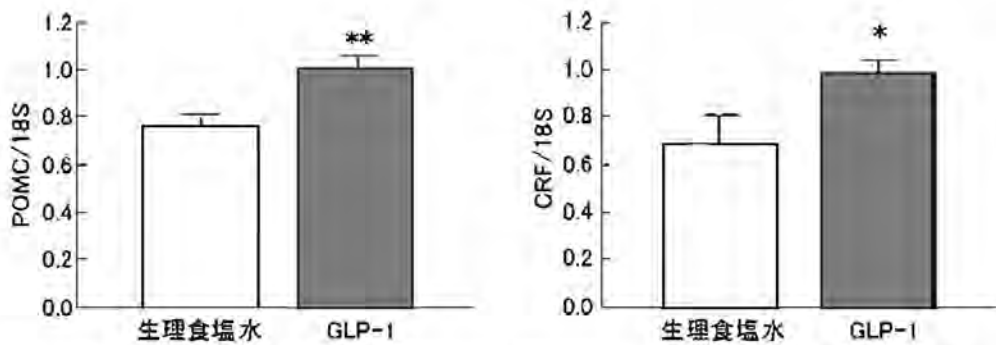


図 1. GLP-1 の中枢投与が視床下部における POMC 及び CRF の mRNA 量に及ぼす影響

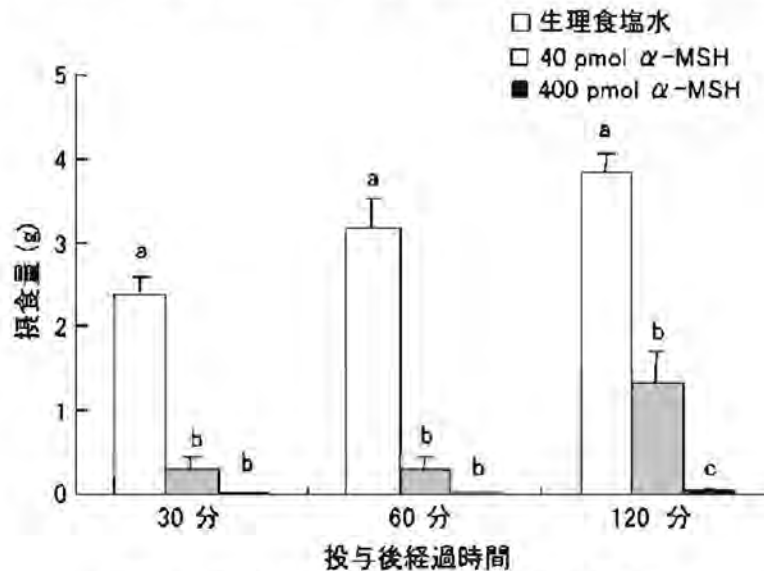


図 2. α -MSH の中枢投与が鼠の摂食に及ぼす影響

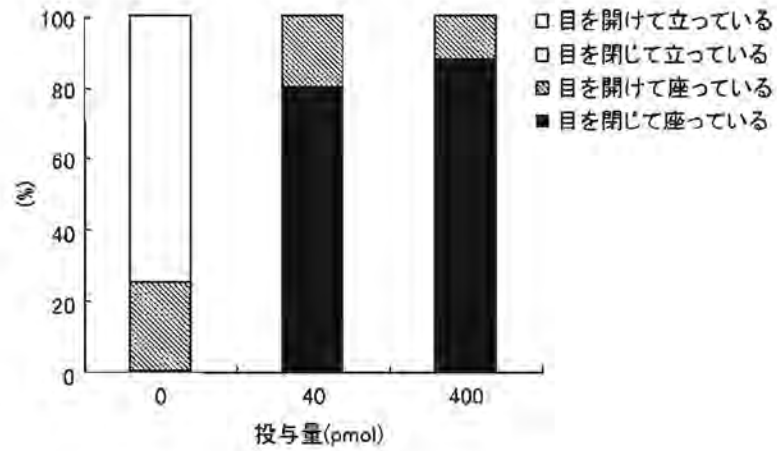


図3. α -MSH の中枢投与が鶏の行動に及ぼす影響

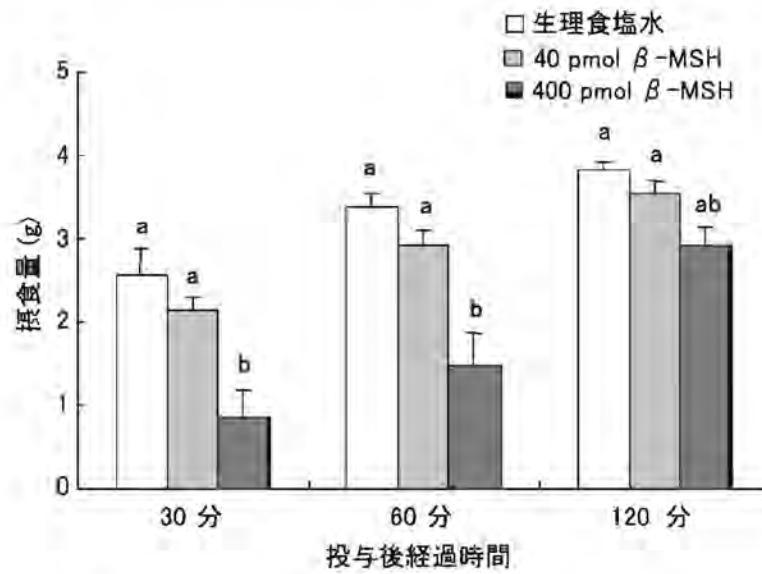


図4. β -MSH の中枢投与が鶏の行動に及ぼす影響

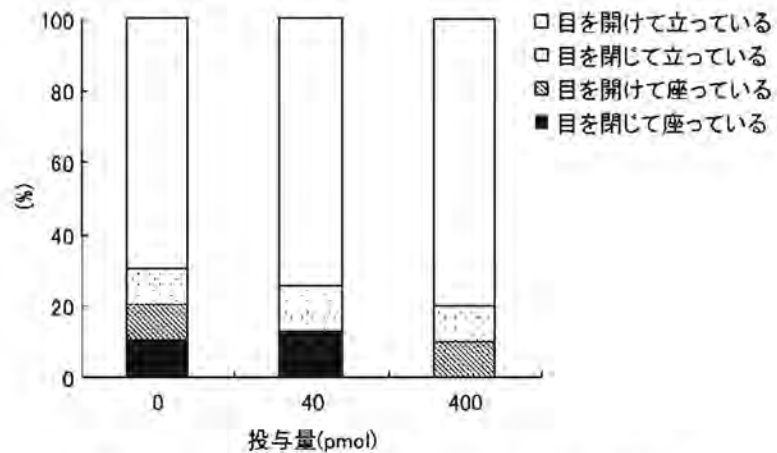


図5. β -MSH の中枢投与が鶏の行動に及ぼす影響

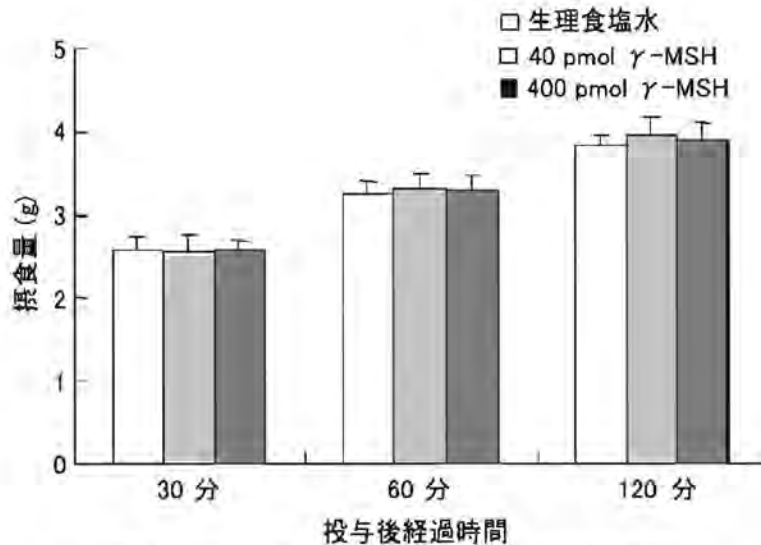


図6. γ -MSHの中枢投与が鶏の摂食に及ぼす影響

リンの合成或いは放出を促がすことを示唆している (Tachibana *et al.*, 2002; Bungo *et al.*, 2001)。これらのことから、GLP-1はCRFの放出を促がすものの、同時にノルアドレナリンの合成或いは放出を促がすことにより、運動量の増加を消失させて入眠を促進することが推察される。最近、 α -MSHの中枢投与が鶏の行動を変化させ、座っている時間を増加させることが報告された (Cline *et al.*, 2007)。また、哺乳動物においてはああるが、 α -MSHと同様に、POMCから産生される他のMSH (β -MSH及び γ -MSH)も摂食抑制作用を有すること (Tung *et al.*, 2006)、 α -MSHの中枢投与により誘導される生殖行動は、ノルアドレナリンを介することが示唆されている (Scimonelli *et al.*, 2000)。これらのことから、GLP-1による入眠の誘導へのPOMC由来神経ペプチド (α 、 β 或いは γ -MSH)の関与が示唆された。

2) POMC由来神経ペプチドの中枢投与が鶏の摂食量と入眠促進行動に及ぼす影響

α -MSHの中枢投与は摂食を強力に抑制した (図2)。又、40及び400 pmolの両投与群のほとんどの個体に睡眠様行動が認められた (図3)。更に、 β -MSHの中枢投与も摂食を抑制したが、その効果は、 α -MSHに比べ、極めて弱いものであった (図4)。更に又、 γ -MSHの中枢投与は鶏の摂食に影響を及ぼさなかった (図6)。 β -MSH或いは γ -MSHの中枢投与は、いずれも睡眠様行動を引き起こさなかった (図5、7)。これらの結果から、3種の神経ペプチドの内、 α -MSHがGLP-1による摂食抑制と入眠促進に関与している可能性が示された。

(2) 牛乳に含まれる入眠促進因子の検索

1) α -ラクトアルブミン酵素分解物の経口投与が小腸プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

α -ラクトアルブミン酵素分解物の経口投与は、カゼイン酵素分解物の経口投与に比べ、小腸遠位部におけるプレプログルカゴンの mRNA 量を有意に増加させた (図8)。これらの結果から、 α -ラクトアルブミン酵素分解物に含まれるペプチドが、プレプログルカゴンの遺伝子発現を増加させることにより、GLP-1を介して入眠を促進することが示唆された。

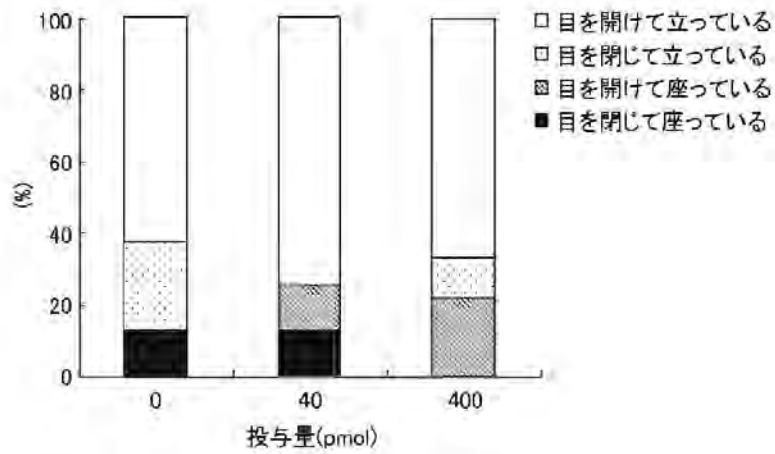


図7. γ -MSH の中枢投与がマウスの行動に及ぼす影響

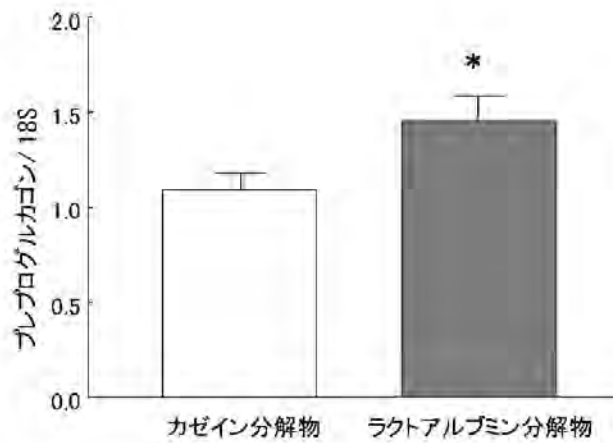


図8. α -ラクトアルブミン酵素分解物の経口投与が小腸プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響

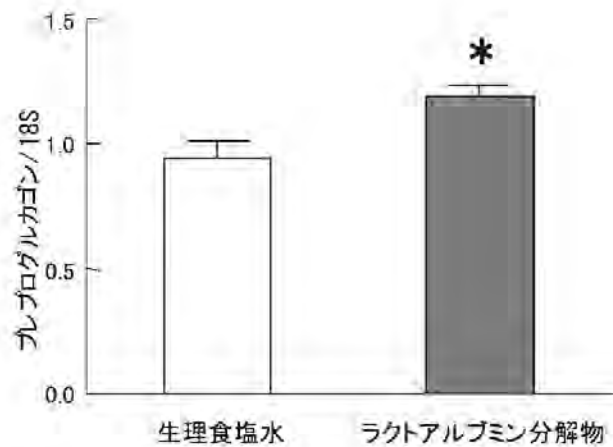


図9. α -ラクトアルブミン酵素分解物が初代培養小腸細胞におけるプレプログルカゴン mRNA 量

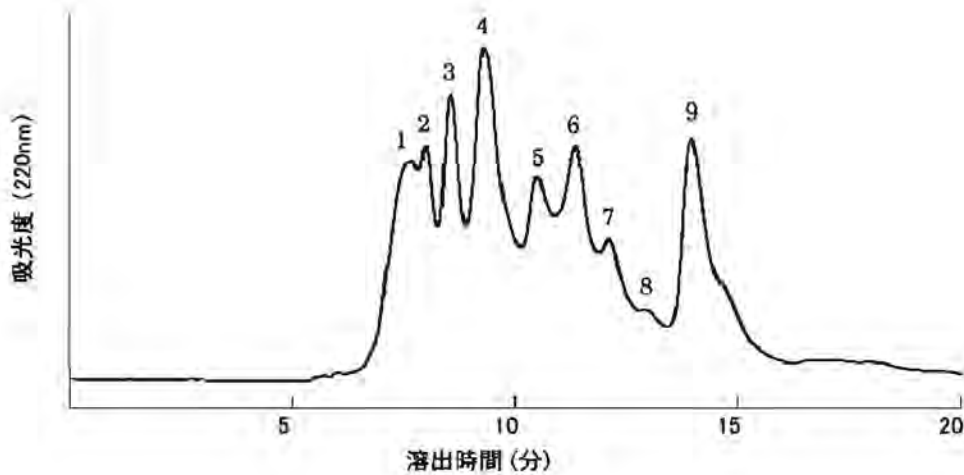


図 10. α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画

2) α -ラクトアルブミン酵素分解物が初代培養小腸細胞プレプログルカゴン mRNA 量に及ぼす影響
 一般に、初代培養細胞系を調製する場合、対象となる組織をコラゲナーゼ処理することにより、単一の細胞を効率よく回収することができる。それ故、まず、コラゲナーゼ処理した小腸細胞を用いてプレプログルカゴンの遺伝子発現を促進するペプチドの検索を試みたが、感度が低いこと、及び、*in vivo* 条件下での再現性が低いことから、コラゲナーゼを使用せずに小腸細胞を調製する方法を試みた。その結果、100 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度の α -ラクトアルブミン酵素分解物の添加により、プレプログルカゴンの mRNA 量を有意に増加させる培養系を確立することができた (図 9)。

3) α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分画

α -ラクトアルブミン酵素分解物のゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果を図 10 に示した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、 α -ラクトアルブミン酵素分解物を 9 の画分に分画・分取した。今後、これらの 9 の画分について、今回 2) で新たに確立した初代培養小腸細胞系を用いてプレプログルカゴンの遺伝子発現を促進する画分を特定し、更に、特定した画分について、逆相カラムクロマトグラフィーによる分画を行なうことにより、 α -ラクトアルブミン酵素分解物に含まれる入眠促進因子を単離することが可能となると判断された。

5. 参考文献

- Bungo, T., Kawakami, S. -I., Ohgushi, A., Sashihara, K., Saito, N., Sugahara, K., Hasegawa, S., Denbow, D. M. and Furuse, M.: Intracerebroventricular injection of fusaric acid attenuates the anorexia by glucagon-like peptide-1 in the neonatal chick. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70, 251-255, 2001.
- Bungo, T., Kawakami, S. -I., Ohgushi, A., Shimojo, M., Masuda, Y., Saito, N., Sugahara, K., Hasegawa, S. and Furuse, M.: Intracerebroventricularly administration of glucagon-like peptide-1 induces sleep-like behavior in the neonatal chick. *Japanese Poultry Science*, 36, 377-381, 1999.

- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., Morgan, L. M. : Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89, 239-248, 2003.
- Hayashi, Y., Sanada, K., Hirota, T., Shimizu, F. and Fukada, Y. : p38 mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25166-25171, 2003.
- Honda, K., Kamisoyama, H., Saneyasu, T., Sugahara, K. and Hasegawa, S. : Central administration of insulin suppresses food intake in chicks. *Neuroscience Letters*, 423, 2, 153-157, 2007.
- Honda, K., Suzuki M., Kamisoyama H., Motoki T., Kano K., Yagi K., Sugawara K., Furuse M. and Hasegawa, S. : Influences of dietary protein types on the suppressive food intake induced by intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1 in chicks. *Japanese Poultry Science*, 37, 251-257, 2000.
- Markus, C. R., Olivier, B., Panhuysen, G. E., Van der Gugten, J., Alles, M. S., Tuiten, A., Westenberg, H. G., Fekkes, D., Koppeschaar, H. F. and de Haan, E. E. : The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1536-1544, 2000.
- McMahon, L. R. and Wellman, P. J. : PVN infusion of GLP-1- (736) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *American Journal of Physiology*, 274, R23-R29, 1998.
- Minet-Ringuet, J., Le Ruyet, P. M., Toméa, D., Even, P. C.: A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152, 335-340, 2004 .
- Nagy, A. D., Csemus, V. J., The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides*, 28, 1767-1774, 2007.
- Sanada, K., Hayashi, Y., Harada, Y., Okano, T. and Fukada, Y. : Role of circadian activation of mitogen-activated protein kinase in chick pineal clock oscillation. *The Journal of Neuroscience*, 20, 986-991, 2000.
- Sarwar, G. and Botting, H. G. : Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *Journal of Nutrition*, 129, 1692-1697, 1999.
- Scimonelli, T., Medina, F., Wilson, C., Celis, M. E. : Interaction of alpha-melanotropin (alpha-MSH) and noradrenaline in the median eminence in the control of female sexual behavior. *Peptides*, 21, 219-223, 2000.
- Smith, M. L., Prall, B., Nandar, W. and Cline, M. A. : Beta-melanocyte stimulating hormone potently

- reduces appetite via the hypothalamus in chicks. *Journal of Neuroendocrinology*, in press.
- Tachibana, T., Hirofuji, K., Matsumoto, M., Furuse, M., Hasegawa, S., Yoshizawa, F., Sugahara, K. : The hypothalamus is involved in the anorexic effect of glucagon-like peptide-1 in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 137, 183-188, 2004.
- Tachibana, T., Oikawa, D., Takahashi, H., Boswell, T. and Furuse M. : The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 147, 173-178, 2007.
- Tachibana, T., Sato, M., Oikawa, D. and Furuse, M. : Involvement of CRF on the anorexic effect of GLP-1 in layer chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 143, 112-117, 2006.
- Tachibana, T., Tanaka, S., Furuse, M., Hasegawa, S., Kato, H. and Sugahara, K. : Intracerebroventricular injection of glucagon-like peptide-1 decreases the monoamine concentrations of the hypothalamus in chicks. *British Poultry Science*. 43, 122-126, 2002.
- Tief, K., Schmidt, A. and Beermann, F. : New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Molecular Brain Research*, 53, 307-310, 1998.
- Tung, Y. C., Piper, S. J., Yeung, D., O'Rahilly, S. and Coll, A. P. : A comparative study of the central effects of specific proopiomelanocortin (POMC) -derived melanocortin peptides on food intake and body weight in pomc null mice. *Endocrinology*, 147, 5940-5947, 2006.
- Yamadera, H. The Topics of Sleep Disorder : Concerning Sleep-wake Rhythm Disorder. *Journal of Nippon Medical School*, 68, 344-348, 2001.
- Zhang, R., Tachibana, T., Takagi, T., Koutoku, T., Denbow, D. M. and Furuse, M. : Centrally administered norepinephrine modifies the behavior induced by corticotropin-releasing factor in neonatal chicks. *Journal of Neuroscience Research*, 74, 630-636, 2003.
- Zhang, R., Nakanishi, T., Ohgushi, A., Ando, R., Yoshimatsu, T, Denbow, D. M. and Furuse, M. : Interaction of corticotropin-releasing factor and glucagon-like peptide-1 on behaviors in chicks. *European Journal of Pharmacology*, 430, 73-78, 2001.