

キस्पепチン／メタスチン—繁殖を制御する 新規神経ペプチド

大蔵 聡 上野山賀久 富川順子 井上直子
束村博子 前多敬一郎†

名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

Kisspeptin/metastatin — a novel neuropeptide controlling reproduction

Satoshi OHKURA, Yoshihisa UENOYAMA, Junko TOMIKAWA, Naoko INOUE,
Hiroko TSUKAMURA and Kei-ichiro MAEDA†

*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, Japan*

(2010年8月30日受付・2010年9月30日受理)

はじめに

乳用牛および肉用牛の生産現場では、人工授精対象牛の微弱発情や、それともなう交配適期の見逃しなどによる受胎成績の低下が問題となって久しい。実際、家畜改良事業団による受胎成績調査によれば、初回授精受胎率は平成元年以降年々低下し、平成19年には乳用牛で約49%、肉用牛で約58%にまで下がっている (<http://liaj.or.jp/giken/gijutsubu/seieki/jyutai.htm>)。受胎成績の低下は、乳肉の生産性の低下に直結することから、この問題は一般紙(朝日新聞2009年8月19日付け夕刊)にも取りあげられるほど、社会的な関心も高い。

また、雌豚においても、雄豚を許容しない鈍性発情や発情の見落としにより、交配適期を逸し、結果的に受胎不成立となることが問題となっている。これらを回避するため、雌豚の確実な発情同期化技術の確立が望まれている。しかし、これまで報告されている種々の方法(プロスタグランジンF_{2α}の反復投与、馬絨毛性性腺刺激ホルモン(eCGまたはPMSG)と人絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の併用投与など)をもってしても確実な技術は確立されておらず、豚の発情同期化技術の難しさが生産性を高めるための障壁となっている。

近年の牛や豚の受胎成績低下の要因については、育種学的な改良によって高い泌乳量や急速な増体などの形質を優先してきた結果として、肝心の繁殖機能が低下した

可能性が指摘されている[1]。受胎成績を向上させ、効率的な繁殖を行うために、家畜生産・臨床の現場ではより有効な繁殖制御技術の向上・確立が望まれているが、それらはまだ開発の途上である。本稿では、まず、繁殖機能制御の内分泌学的背景を概説し、後半では、動物の生殖を司る内因性神経ペプチドとして近年注目を集めているキस्पепチンの生理作用を紹介する。最後に、家畜の繁殖をコントロールするための新たな技術としてのキस्पепチン利用の展望を述べたい。

性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)分泌のふたつのモード：パルス状分泌とサージ状分泌

下垂体前葉から分泌されるふたつの性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)、すなわち、黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)は、雌性動物においては、お互いが協調して卵巣にはたらきかけ、卵胞の発育と排卵を促し、発情周期をコントロールしている。ゴナドトロピンの分泌は視床下部ホルモンであるGnRHにより制御される。よって、発情周期は、GnRHという神経ペプチドを頂点とした、視床下部—下垂体—性腺軸という調節ユニットによって内分泌的に制御されている。

GnRH分泌には、パルス状とサージ状のふたつのモードがある(図1)。基底レベルのGnRH分泌は、間欠的な濃度上昇を一定の間隔で規則正しく繰り返しており、これを「パルス状分泌」という。GnRHのパルス状分泌

† 連絡責任者：前多敬一郎(名古屋大学大学院生命農学研究科)

〒464-8601 名古屋市千種区不老町 ☎052-789-4073 FAX 052-789-4072 E-mail: kei_maeda@nagoya-u.jp

を反映して、下垂体前葉からのLHの分泌もパルス状となる。GnRHパルスの頻度は動物種によって固有の値を示す。たとえば、ラットでは卵胞が発育する卵胞期には20～30分に1回のパルスがあり、羊や山羊では卵胞期には40～60分に1回、また、排卵後の黄体期には数時間に1回程度である。パルス状のGnRH分泌は、パルス状のLH分泌を介して、雌の発情周期各ステージにおける性ステロイドホルモンの分泌を刺激するとともに、卵胞期には卵胞発育を促進する。このようなパルス状のGnRH/LH分泌は、動物にストレスや苦痛を与えることなく頻回に血液を採取する手法と、微量の血中ホルモン濃度を鋭敏に測定できる技術（ラジオイムノアッセイ）の開発によって詳しく調べられるようになった。

GnRHが適切な頻度でパルス状に分泌されることは、GnRHに対する下垂体の反応性を正常に保つために重要とされる。このパルス状のGnRH放出がもつ生理的な意義は、米国の研究グループの先導的な研究により明確に示された [2]。彼らは、視床下部の電気破壊によって内因性のGnRHパルスを消失させ、卵胞発育や排卵がみられないアカゲザルを用いて実験を行った。このような猿に、生理的頻度（1時間に1回）よりも高い頻度でGnRHを投与したり、あるいは持続的にGnRHを投与したりして血中のGnRH濃度を常に高い値に維持すると、下垂体前葉からのLH分泌がかえって抑制されることを明らかにした。いっぽう、1時間に1回の生理的頻度でGnRHを投与したときには、血中LH濃度が正常値となり、視床下部の電気破壊によって消失していた卵胞発育や排卵がふたたびみられるようになったのである。このように、動物の発情周期の維持には、生理的な頻度のパルス状GnRH放出が重要な役割を果たしている。

いっぽう、もう一つのGnRH分泌動態として、雌の発情周期では排卵前にGnRHが一過性に大量放出されるモードがある。これがGnRHの「サージ状分泌」である（図1）。雌では、このGnRHのサージ状分泌を受けて下垂体前葉からLHの大量放出（LHサージ）が起こり、排卵が誘起される。すなわち、GnRHのサージ状分泌は排卵を誘起するために重要な分泌モードである。ラットでは発情前期の夕方にLHサージが観察され、その濃度は基底レベルの平均血中濃度の数10倍にもなる。自発的な排卵がみられる動物種（ラット、マウス、牛、山羊、猿、人など）では、自発的なGnRH/LHサージが出現したあとに排卵が起きる。いっぽう、交尾排卵動物と呼ばれる動物種（ウサギ、猫など）では自発的なGnRH/LHサージはなく、交尾刺激が加わることによってはじめてLHサージが誘起され、排卵にいたる。いずれの動物種においても、LHサージは卵巣の成熟卵胞に作用して、直接排卵を誘起する働きをしている。排卵前のLHサージを誘起するGnRHサージは、LHサージの

出現に先立って開始する。羊では、GnRHサージがLHのサージ状分泌の持続時間（約10時間）を大きく超えて（約16時間）持続することが明らかにされている [3]。なお、パルス状のGnRH/LH分泌は雄でも雌と同様に観察されるが、興味深いことにサージ状の大量分泌は雄では起こらない。この性差は、雄と雌の脳は、それぞれ機能的にも形態的にも異なって分化することにより、雄の脳ではGnRHサージを引き起こす機能が失われることに起因すると考えられている。

GnRH分泌のフィードバック制御

卵巣からは発情周期の各フェーズに応じて異なる性ステロイドホルモンが分泌される。卵胞期には卵胞からのエストロゲン分泌が、黄体期には黄体からのプロゲステロン分泌が優位となる。これらの性ステロイドホルモンは、視床下部に作用してパルス状GnRH分泌を抑制する。この抑制作用は「負のフィードバック」と呼ばれ、発情周期の各フェーズにおけるパルス状のGnRH分泌を正常に保つ働きをもつ。つまり、視床下部—下垂体—性腺軸という調節ユニットの恒常性を維持するために重要な調節メカニズムといえる（図1）。卵巣を除去した動物では負のフィードバック作用がないため、それぞれの動物種で取り得る最高の頻度のGnRH/LHパルスが観察される。たとえば、ラットでは15～20分、山羊では20～30分、猿で40～60分に1回のGnRH/LHパルス頻度になる。性ステロイドホルモンによる負のフィードバックは雄でも存在し、精巣由来のアンドロゲンがGnRH/LHパルス頻度を抑制することにより、正常な精巣機能が保たれる。

性ステロイドホルモンによる負のフィードバックは雌雄共通にみられるのに対し、GnRHサージを引き起こす「正のフィードバック」は雌に特有の排卵調節メカニズムである（図1）。雌性動物では、卵胞期のGnRH/LHパルスによって卵胞の発育が刺激されると、卵胞からのエストロゲン分泌が徐々に高まる。卵胞が排卵可能な状態にまでに成熟し、血中エストロゲン濃度が高まると、一転してエストロゲンの作用はそれまでの負のフィードバックから正のフィードバックへと切り替わり、GnRH/LH分泌を促進する。この結果、GnRHおよびLHの一過性の大量放出、すなわちサージ状分泌が引き起こされ、排卵が誘起されるのである。

パルス状あるいはサージ状のGnRH分泌に対する性ステロイドホルモンのフィードバック制御メカニズムについては、いまだよく分かっていない。たとえば、雌においてフィードバック作用に重要な役割を演じているエストロゲン受容体 α （ER α ）は、視床下部のGnRHニューロンに発現していない [4]。このため、GnRH分泌に対するエストロゲンのフィードバックは、GnRH

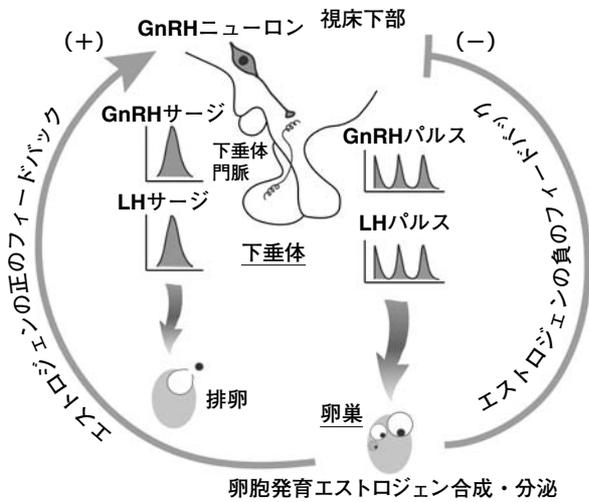


図1 雌性動物におけるふたつのGnRH/LH分泌モードとエストロジェンによるフィードバック制御

視床下部からのGnRHパルスを反映して下垂体からのLH分泌はパルス状となる。LHパルスによって、卵巣の卵胞発育やエストロジェンの合成が刺激される。エストロジェンは視床下部に負のフィードバック作用を現し、GnRH/LHのパルス状分泌に対して抑制的にはたらく。卵胞の成熟に伴って血中のエストロジェン濃度が上昇すると、エストロジェンは正のフィードバック作用を現し、GnRH/LHのサージ状分泌を誘起する。LHサージに曝露された成熟卵胞は排卵にいたる。

ニューロンに直接働いて起こるのではなく、ER α をもつ他のニューロン群が仲介していると考えられてきた。これまで多くの動物種において、ER α は視索前野、中隔野などの視床下部前方および視床下部腹内側核、室傍核、弓状核などの神経核に存在することがわかっており、これらの脳領域のうちのいくつかはエストロジェンの正あるいは負のフィードバックを仲介する領域であると考えられている。たとえば、エストロジェンの正のフィードバックを仲介する脳領域は、ラットを用いた実験によって、これまでのところ視索前野や前腹側室周囲核などの視床下部前方領域であると考えられている。卵巣除去ラットの脳内にエストロジェンを植え込んで血中LH濃度を測定すると、視索前野などの視床下部前方領域に植え込んだときにGnRH/LHサージが誘起されるからである [5]。しかし、発情周期中に血中エストロジェン濃度が低濃度から高濃度へと変化したときに、負のフィードバック作用から正のフィードバック作用に転換するメカニズムはよくわかっていない。

このように、正および負のフィードバック機構は、エストロジェンがGnRH分泌に対して、それぞれ促進的または抑制的と正反対の方向に働くという実に不思議な現象であり、その実態は長いあいだ謎のままであった。しかしながら、後述するキスペプチンの発見により、その実態の一部が明らかにされようとしている。

キスペプチン

キスペプチン (kisspeptin) は武田薬品工業㈱の ohtaki ら [6] により、2001 年に人胎盤抽出物から同定された生理活性ペプチドである。ohtaki らは、腫瘍転移抑制遺伝子として同定されていた人 *Kiss1* 遺伝子の産物が、G タンパク共役型のオーファン (みなしご) 受容体である GPR54 の内因性リガンドであることを発見したのである。オーファン受容体とは、ゲノムデータベースの解析から G タンパク共役型受容体として、内因性リガンドより先に同定されていた受容体のことをいう。さて、ohtaki らは、54 個のアミノ酸からなるこのペプチドが腫瘍転移 (metastasis) 抑制作用をもつことを示し、その作用にちなんでこの新規ペプチドを「メタスチン (metastin)」と命名した。ほぼ同時期に (しかし、若干遅れて)、ベルギーの研究グループも人 *Kiss1* 遺伝子産物が GPR54 の内因性リガンドであることを見だし [7]、このペプチドを遺伝子名にちなんで「キスペプチン」と呼んだ。後述するように、繁殖機能の制御というこの新規ペプチドの生理機能を考えれば、キスペプチンというネーミングは実を射たものであったといわざるを得ない (「キス」は生殖を連想させる)。現在では、第一発見者である ohtaki らのネーミングは生殖生理学の研究領域ではほとんど使われることがなく、「キスペプチン」が呼称として統一されつつあり、ohtaki らが発見した 54 個のアミノ酸からなる人ペプチドを特に「メタスチン」と称するようになってきている。この流れは、第一発見者の優先権を尊重するのが科学の基本であることを考えれば残念なことではあるが、本稿でも混乱を避けるため、今後は基本的には「キスペプチン」と表記することとする。ちなみに *Kiss1* 遺伝子の由来は、1996 年に米国ペンシルバニア州立大学の研究グループが、腫瘍転移抑制能を持つ遺伝子をクローニングしたとき [8] に、「仮の抑制遺伝子配列」を意味する「interim suppressor sequence」の頭文字と、大学が立地する町、ハーシーにある世界的に有名な菓子メーカー (ハーシー社) の「Kiss chocolate」をもじったものであるという。何ともしゃれっ気たっぷりのネーミングである。

当初、腫瘍学領域で着目されていたキスペプチンが、突如として生殖生理学研究の分野で脚光を浴びることとなった。2003 年になって、米国ハーバード大学のグループとフランスの研究グループがほぼ同時期に GPR54 を欠損した人の家系では性成熟が到来しないことを報告したからである [9, 10]。この研究が発表されて以降、キスペプチンが人を含む動物の生殖機能制御の中心的なペプチドであることを示す証拠が次々と出され、現在にいたっている。繁殖・生殖を連想させる「キスペプチン

ン」のネーミングが当を得たものとなった。特に、キスペプチンが視床下部一下垂体—性腺軸という、繁殖をコントロールする調節ユニットのさらに上位に位置し、視床下部からのGnRH分泌を調節する神経ペプチドであることが明らかになるにつれ、その繁殖技術への応用の可能性に期待が高まってきている。

キスペプチンによるGnRH分泌制御メカニズム

これまで調べられた多くの動物種において、キスペプチンの投与により性腺刺激ホルモンの分泌が強く刺激されることがわかってきた [11-16]。ラットをはじめとしてこれまで調べられた多くの動物種において、雌ではキスペプチンニューロンの脳内分布にはふたつのグループがあることがわかってきた。一つは視床下部弓状核と呼ばれる神経核に局在し、もう一つは前腹側室周囲核（ラットなどげっ歯類）もしくは内側視索前野（羊、山羊などの反芻家畜）である [17, 18]。これらの脳領域は、それぞれパルス状のGnRH分泌とサージ状のGnRH分泌を調節している領域と考えられてきた。よって、それぞれに局在するキスペプチンニューロンが、これらのふたつのモードのGnRH/LH分泌を制御していることが予想された [19]。

ラットやマウスでは、視床下部弓状核と前腹側室周囲核に存在するそれぞれのキスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 遺伝子発現が、エストロゲンによってまったく正反対の制御を受けることが明らかとなった [17]。すなわち、視床下部弓状核ではエストロゲンによって *Kiss1* 遺伝子発現が抑制されるのに対し、前腹側室周囲核ではエストロゲンにより *Kiss1* 遺伝子発現が促進される。また、これらのキスペプチンニューロンにはエストロゲン受容体である $ER\alpha$ が共存しており [12, 17]、さらにこのエストロジェンの *Kiss1* 遺伝子発現の調節作用は、 $ER\alpha$ ノックアウトマウスを用いた研究によって、 $ER\alpha$ を介する作用であることが明らかにされた [20]。これらの事実は、視床下部に存在するふたつのキスペプチンニューロン群が、エストロジェンの正負のフィードバック作用を仲介するニューロン群である可能性を示している。つまり、それぞれに存在するキスペプチンニューロンが正負のフィードバック作用のターゲットであると考えられ、いまだ詳細なメカニズムがわかっていないエストロゲンによるフィードバックメカニズムを解き明かす鍵となると考えられている (図2)。

弓状核を含む視床下部内側基底部は、長い間、パルス状のGnRH放出を制御する神経機構（GnRHパルスジェネレーター）が存在していると考えられてきた部位である [21]。GnRHパルスジェネレーターを構成するニューロン群が $ER\alpha$ をもつならば、エストロゲンによってパルス状のGnRH分泌が効率よく制御されること

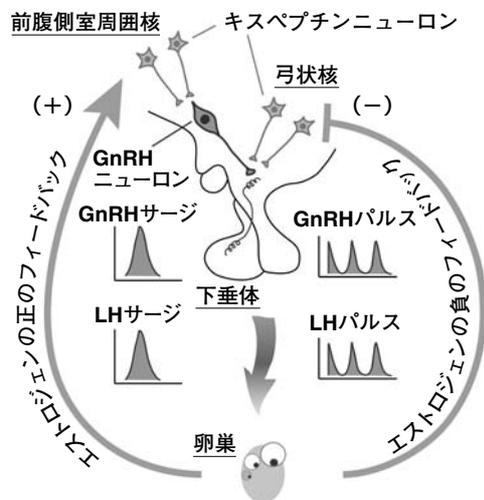


図2 エストロゲンによるGnRH分泌のフィードバック制御メカニズムにおける視床下部キスペプチンニューロンの役割

げっ歯類では、前腹側室周囲核と視床下部弓状核に存在するふたつのキスペプチンニューロン群が、卵巣由来のエストロゲンによる正負のフィードバック作用を仲介するニューロン群である可能性が示されている。

になる。これまでに分かった事実、すなわち弓状核のキスペプチンニューロンには $ER\alpha$ が共存し、またこの神経核での *Kiss1* 遺伝子発現がエストロゲンによって抑制制御（負のフィードバック）を受けることは [17]、パルス状のGnRH分泌のフィードバック制御を説明するモデルにぴったりとあてはまる。つまり、弓状核のキスペプチンニューロンがGnRHパルスジェネレーター本体であり、エストロジェンの負のフィードバックを仲介していると考えられることができる。最近われわれは、山羊弓状核のキスペプチンニューロンの近くに留置した電極から、パルス状のLH分泌と同期した神経活動を記録することに成功した [15]。さらに、弓状核のキスペプチンニューロンが、共存する別の2つのペプチド、すなわちニューロキニンBおよびダイノルフィンとの協働作用により、パルス状のGnRH/LH分泌を制御する可能性を示した [22]。このように、弓状核のキスペプチンニューロンがGnRHパルスジェネレーター本体である可能性はますます高くなってきた。

いっぽう、先に述べたように、エストロジェンの正のフィードバックを仲介する脳領域は、ラットやマウスでは前腹側室周囲核と呼ばれる視床下部前方の領域であると考えられている。前腹側室周囲核の *Kiss1* 遺伝子発現が、エストロゲンによる促進的な制御（正のフィードバック）を受けることは、この領域のキスペプチンニューロンがGnRHのサージ状分泌を制御する働きをもつ可能性を示唆する。興味深いことに、雌ではエストロゲンの作用により、前腹側室周囲核のキスペプチン発現

牛	1	GAALCPP—ESSAGPQRLGPCAPRSRLIPSPRGAVLVQREKDVSAYNWNSFGLRY	53
山羊	1	GAALCPS—ESSAGPRQPGPCAPRSRLIPAPRGAVLVQREKDVSAYNWNSFGLRY	53
羊	1	GAALCPS—ESSAGPRQPGPCAPRSRLIPAPRGAAALVQREKDVSAYNWNSFGLRY	53
豚	1	GTSSCQPPESSSGPQRPGLCTPRSRLIPAPRGAVLVQREKDL SAYNWNSFGLRY	54
マウス	1	—SSPCPPVEGPAGRQRP—LCASRSRLIPAPRGAVLVQREKDLSTYNWNSFGLRY	52
ラット	1	—TSPCPPVENPTGHQRP—PCATRSRLIPAPRGSVLVQREKMSAYNWNSFGLRY	52
人	1	GTSLSPPESSGSRQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF	54

図3 各動物種のキスペプチン推定アミノ酸配列

網掛け部分はコアペプチド（キスペプチン-10），太字は牛キスペプチンと異なるアミノ酸を示す．牛，山羊，豚のキスペプチンは，われわれのグループによりクローニングし，cDNAの塩基配列および推定アミノ酸配列の同定を行った．

が増加するのに対し，雄ではこの効果がみられない [17]．このようなキスペプチンニューロンの性的二型性は，GnRH/LH サージが雌にだけみられるというゴナドトロピン分泌の二型性と実によく一致している．さらに，われわれは生後間もない雄ラットから精巣を除去すると，成熟後の高濃度エストロゲン投与によって雌ラットと類似した前腹側室周囲核キスペプチン発現と LH サージの誘起が可能であることを明らかにした [23]．前腹側室周囲核に局在するキスペプチンニューロンが GnRH サージの発生機構本体であるとの仮説が現実味を帯びてきている．

おわりに：繁殖制御剤としてのキスペプチンの可能性

本稿でこれまで述べてきたように，キスペプチンは，卵胞発育を刺激するモードであるパルス状の GnRH 分泌や，排卵を誘起する一過性の大量放出モードであるサージ状の GnRH 分泌を調節する主要なペプチドであることが明らかにされつつある．また，キスペプチンは，中枢だけでなく，末梢への投与によっても強い LH 分泌促進効果を示すことから，応用への期待が大きい．キスペプチンの生理効果をもたらすとされるコアペプチドは，C 末端側の 10 個のアミノ酸からなるペプチド（キスペプチン-10）である（図3）．生体内に存在する内因性のキスペプチン分子のサイズについてはいまだ確定的なデータは出ていないが，生理活性を示すコアペプチドがこのキスペプチン-10 であることは，受容体との結合能を調べた ohtaki ら [6] の報告などから明らかとなっている．キスペプチン-10 のアミノ酸配列は，これまでのところ反芻動物や豚などの家畜を含め，多くの動物で共通である（図3）．また，人，猿などの霊長類においても，C 末端のアミノ酸残基一つ（霊長類では F）を除いて相同である上，このアミノ酸置換（Y→F）はキスペプチンのゴナドトロピン分泌促進作用に影響を与えないことも明らかとなっている [24]．この事実は，キスペプチン-10 やその類縁ペプチドが，種を超えた生殖制御を可能とするホルモン製剤として有用であることを物語る．これまで牛や豚の発情同期化・過排卵処置に多用されている eCG や hCG などの異種のホルモン製剤では，

その反復投与によって抗体が作られ，結果的にホルモン製剤の効力が落ちてしまうことが問題となってきた．この点で，キスペプチンのコアペプチド，あるいはその類縁物質は，畜種や投与回数などに制約のない，優れたホルモン製剤となり得る可能性を秘めていると，われわれは考えている．

本研究は生研センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の一部として実施した．

引用文献

- [1] 中尾敏彦：最新「乳牛の繁殖管理指針」，136，酪農総合研究所，札幌（2000）
- [2] Knobil E：The neuroendocrine control of the menstrual cycle, *Recent Prog Horm Res*, 36, 53-88 (1980)
- [3] Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ：Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe：existence of a preovulatory GnRH surge, *Endocrinology*, 129, 1175-1182 (1991)
- [4] Herbison AE：Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons, *Endocr Rev*, 19, 302-330 (1998)
- [5] Goodman RL：The site of the positive feedback action of estradiol in the rat, *Endocrinology*, 102, 151-159 (1978)
- [6] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M：Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, *Nature*, 411, 613-617 (2001)
- [7] Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M：The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54, *J Biol Chem*, 276, 34631-34636 (2001)
- [8] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR：KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, *J Natl Cancer Inst*, 88, 1731-1737 (1996)

- [9] Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuo-hung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH : The GPR54 gene as a regulator of puberty, *N Engl J Med*, 349, 1614-1627 (2003)
- [10] de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E : Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10972-10976 (2003)
- [11] Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA : A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse, *Endocrinology*, 145, 4073-4077 (2004)
- [12] Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K-I : Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats, *Endocrinology*, 146, 4431-4436 (2005)
- [13] Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T : Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat, *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 383-388 (2004)
- [14] Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA : Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 1761-1766 (2005)
- [15] Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda K-I, Okamura H : Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat, *J Neuroendocrinol*, 21, 813-821 (2009)
- [16] Shahab M, Mastrorandi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM : Increased hypothalamic GPR54 signaling : a potential mechanism for initiation of puberty in primates, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 2129-2134 (2005)
- [17] Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K-I : Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats, *J Reprod Dev*, 53, 367-378 (2007)
- [18] Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A : Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha, *Neurosci Lett*, 401, 225-230 (2006)
- [19] Ohkura S, Uenoyama Y, Yamada S, Homma T, Takase K, Inoue N, Maeda K-I, Tsukamura H : Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats, *Peptides*, 30, 49-56 (2009)
- [20] Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA : Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse, *Endocrinology*, 146, 3686-3692 (2005)
- [21] Maeda K-I, Tsukamura H, Ohkura S, Kawakami S, Nagabukuro H, Yokoyama A : The LHRH pulse generator : a mediobasal hypothalamic location, *Neurosci Biobehav Rev*, 19, 427-437 (1995)
- [22] Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H : Neuropeptide B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat, *J Neurosci*, 30, 3124-3132 (2010)
- [23] Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K-I, Tsukamura H : Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats, *Biol Reprod*, 81, 1216-1225 (2009)
- [24] Pheng V, Uenoyama Y, Homma T, Inamoto Y, Takase K, Yoshizawa-Kumagaye K, Isaka S, Watanabe TX, Ohkura S, Tomikawa J, Maeda K-I, Tsukamura H : Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats, *J Reprod Dev*, 55, 378-382 (2009)