

# ハムスターの GnIH の同定および発現制御と生理機能の解析

産賀 崇由, 井上 和彦, 筒井 和義

早稲田大学教育・総合科学学術院/先端生命医科学センター

## はじめに

1970年代初めに,ゴナドトロピン(黄体形成ホルモン:LH, ろ胞刺激ホルモン:FSH)の分泌を促進する神経ペプチドである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が発見された[1-5].一方,生殖腺から分泌される性ステロイド,フォリスタチン,インヒピンによるゴナドトロピン分泌の抑制作用が知られていたが,ゴナドトロピン分泌を抑制する神経ペプチドの存在は永く不明であった.筒井らは日本ウズラ(*Coturnix japonica*)の脳から単離したSIKPSAYLPLRF-NH<sub>2</sub>という構造を有する新規の神経ペプチドが下垂体からのゴナドトロピンの放出を抑制することを見出し,これを生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(GnIH)と名付けた[6].鳥類においてGnIHを産生する神経細胞体は視床下部の室傍核に存在し,その神経線維は正中隆起に投射する[6-10].GnIH受容体はウズラの下垂体に発現しており[11],GnIHは下垂体に作用してゴナドトロピンの合成と放出を抑制する[6,12,13].また,GnIH免疫陽性の神経線維はGnRH免疫陽性の神経細胞体に投射しており[14,15],GnRH免疫陽性神経細胞体にはGnIH受容体mRNAが発現している[15].したがって,GnIHは下垂体に直接作用するだけでなく,GnRHニューロンにも作用してゴナドトロピン分泌を抑制すると考えられる[16-18].

GnIHは魚類,両生類,アカゲザル(*Macaca mulatta*) [19]やヒト(*Homo sapiens*) [20]を含む哺乳類の脳に存在する[16-18].GnIHはRFamideペプチドファミリーに属し,C末端側にはLPXRFamide(X=L or Q)構造を有する[16-18].鳥類のGnIH前駆体mRNAは3つのLPXRFamideペプチド(GnIH, GnIH-RP-1, GnIH-RP-2)をコードし,哺乳類のGnIH前駆体mRNAは2

つのLPXRFamideペプチド(RFRP-1, RFRP-3)をコードする[16-18].GnIH受容体はGタンパク共役型受容体の1つであるGPR147である[11,15-21].GnIHや哺乳類のGnIH(RFRP-3)はシリアンハムスター(*Mesocricetus auratus*) [22]やラット(*Rattus norvegicus*) [23,24]においてLHの分泌を抑制する.また,哺乳類のGnIH(RFRP-3)はヒツジ(*Ovis aries*) [25,26]やウシ(*Bos primigenius*) [27]においてLHのパルス状分泌を抑制する.

季節繁殖を行う多くの鳥類や哺乳類では,松果体から夜間に分泌されるメラトニンの分泌パターンに依存して生殖が制御されると考えられているが[28-32],われわれは季節繁殖を行うウズラにおいて,メラトニンがメラトニン受容体の1つ(Mel<sub>1c</sub>)を介して直接GnIHニューロンに作用してGnIHの発現[33]と放出[34]を制御することを以前に見出した.また,最近になり,ハムスター[35,36]やヒツジ[37]においてもGnIHの発現は光周期により制御されることが報告された.哺乳類においてGnIHニューロンが存在する脳領域である視床下部背内側部(DMH)はメラトニンが生殖周期を制御するために必須の脳領域であることが知られており[38,39],メラトニンは哺乳類においてもGnIHニューロンを介してゴナドトロピンの放出を制御する可能性が考えられる.

シベリアンハムスター(*Phodopus sungorus*)は,光周期による視床下部下垂体-性腺軸を介した生殖制御を研究する良いモデル動物として広く用いられている.したがって,本研究において,われわれはまず,シベリアンハムスターのGnIH前駆体cDNAの配列をPCRクローニングにより決定し,成熟GnIHペプチドをHPLCと質量分析により単離・同定した.次に,光周期の違いや松果体除去とメラトニン投与がGnIH前駆体mRNAや成熟GnIHペプチド(RFRP-1とRFRP-3)の発現にどのような影響を及ぼすのかを調べた.また,光周期によるGnRH免疫陽性神経細胞体に投射するGnIH免疫陽性神経線維の変化,GnRH免疫陽性神経細胞体におけるGnIH受容体の発現を調べた.最後に,GnIHの生理作用を明らかにするため,異なる光周期にあるハムス

連絡先:産賀崇由,早稲田大学教育・総合科学学術院生物学教室統合脳科学研究室 早稲田大学先端生命医科学センター(TWIns)

〒162-8480 東京都新宿区若松町2番2

TEL:03-5369-7369 内線(3201)

FAX:03-3355-0316

E-mail:tubuka@aoni.waseda.jp

MEIISKRIFILLTLATSSLLTSNIFCTEELMMPHFHSKEKEDKYSQPTGISKGEKERSVS 60  
 FQEVKDWGAKNVIKMSAPANKVPHSAANLPLRFGR<sup>T</sup>LEEDRSTRARTNMEAR<sup>T</sup>LSRVPS 120  
 LPQRFGR<sup>T</sup>TARSIPKTLSHLLQRF<sup>L</sup>LSMATSEVLNAMTCQHGEIQSPGGKQPRRQAFMET 180  
 DDEEGKHEK 189

図1 シベリアンハムスター GnIH 前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列  
 ハムスター GnIH ペプチド (RFRP-1 と RFRP-3) として切り出されると推定されるアミノ酸配列を囲んだ (RFRP-1: 76-96, RFRP-3: 114-127. GnIH ペプチドに特徴的な LPXRF (X=L or Q) 配列を太字で示した。

	Retention time on HPLC (min)		Observed mass ([M+H] <sup>+</sup> )		Theoretical mass ([M+H] <sup>+</sup> )
	Native	Synthetic	Native	Synthetic	Monoisotopic value
Hamster RFRP-1	30-32	30.7	1986.3	1986.4	1986.1
Hamster RFRP-3	28-30	28.4	1399.8	1399.9	1399.8

図2 内因性および合成ハムスター GnIH (RFRP-1と RFRP-3) の HPLC における挙動および質量分析による質量数

ターに成熟 GnIH ペプチド (RFRP-1と RFRP-3) を脳室投与して血中ゴナドトロピン濃度がどのように変化するかを調べた。

### シベリアンハムスターの GnIH 前駆体 cDNA の配列

5'/3' RACE 法によりシベリアンハムスターの GnIH 前駆体 cDNA の全長配列を決定した (GenBank JF727837). GnIH 前駆体 cDNA は全長811塩基からなり, 5'末端側から51塩基の非翻訳領域, 567塩基の翻訳領域, 193塩基の非翻訳領域よりなる. 翻訳領域は189アミノ酸からなるポリペプチドをコードし, そのポリペプチドは, グリシン (G) とアルギニン (R) からなる C 末端のアミド化シグナルを持つ2つの LPXRF (XはLまたはQ) 配列を含んでいた (図1)。

### 成熟 GnIH ペプチドの同定

次にわれわれは, シベリアンハムスターの脳の抽出液を GnIH 抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製し, HPLC 溶出液中の GnIH 免疫陽性分画に存在した成熟 GnIH ペプチドを質量分析 (MALDI-TOF-MS) により同定した. 成熟 GnIH ペプチドの質量は GnIH 前駆体 cDNA の配列から推定されるアミノ酸配列 (図1) から予想した. HPLC において 28~30分および30~32分に溶出した物質の質量はそれぞれ1,399.8と1,986.3m/z([M+H]<sup>+</sup>)であったが(図2), これらの数値は GnIH 前駆体 cDNA の配列から推定された TLSRVPSLPQRF-NH<sub>2</sub> (RFRP-3) および SPAPANKVPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub> (RFRP-1) の理論値と同じであった(図2). 次に, これらのペプチドを合成し,

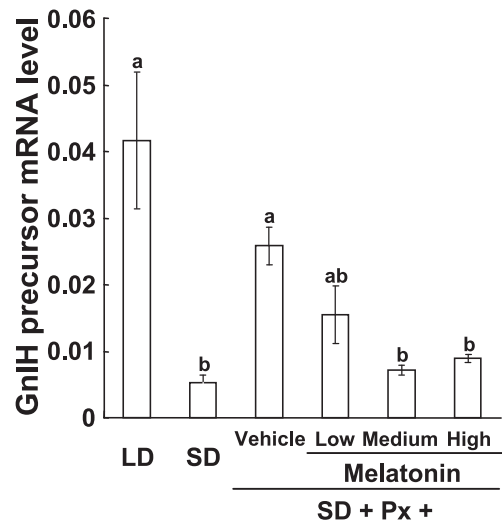


図3 光周期, 松果体除去, メラトニン投与による GnIH 前駆体 mRNA 発現の変化  
 LD: 長日条件, SD: 短日条件, Px: 松果体除去. n=4. カラム上の異なる文字は統計的有意差を示す (P<0.05).

合成物と天然物を用い, HPLC における挙動と質量分析における質量値を比較したところ, 両者の数値は一致した (図2)。

### 光周期, 松果体除去, メラトニン投与による GnIH 前駆体 mRNA 発現の変化

GnIH 前駆体 mRNA の発現量は, ハムスターを13週間短日条件下 (8時間明:16時間暗) に置くと長日条件下 (16時間明:8時間暗) のハムスターに比較して著しく低下することが定量的 RT-PCR 法により明らかになった (図3). メラトニン合成器官である松果体を除去してハムスターを13週間短日条件下に置いた場合は GnIH

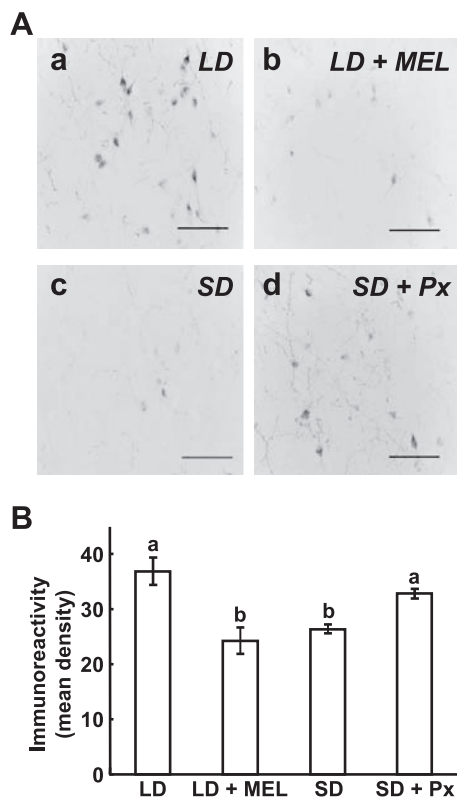


図4 光周期, メラトニン投与, 松果体除去によるGnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性の変化  
 A GnIH抗体によるハムスター視床下部背内側領域の免疫染色. スケールバーの長さはすべて100  $\mu$ mを示す. B GnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性.  
 LD: 長日条件, SD: 短日条件, MEL: メラトニン投与, Px: 松果体除去. n=4. カラム上の異なる文字は統計的有意差を示す ( $P < 0.05$ ).

前駆体 mRNA 発現の発現量は低下しなかったが, 松果体を除去したハムスターにメラトニンをサイラスティックプレートにより皮下投与するとGnIH前駆体 mRNAの発現量が著しく低下した(図3).

### GnIH免疫陽性神経細胞体の分布と光周期, メラトニン投与, 松果体除去による免疫反応性の変化

シベリアンハムスターの脳におけるGnIH免疫陽性神経細胞体の分布を免疫染色法により調べた. GnIH免疫陽性神経細胞体は前視床下部, 視床下部背内側核, 乳頭体前核にわたる視床下部内側部に分布していた(図4A). GnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性はハムスターを13週間短日条件下に置くと長日条件下のハムスターに比較して低下した(図4Aa, c, B). 短日条件下では夜間に松果体から分泌されるメラトニンの分泌時間が長くなる. そこで長日条件下のハムスターにメラトニ

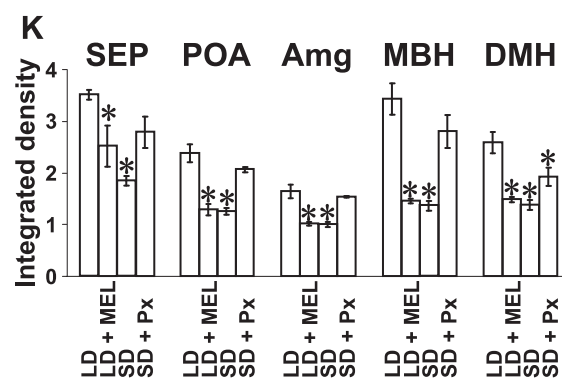
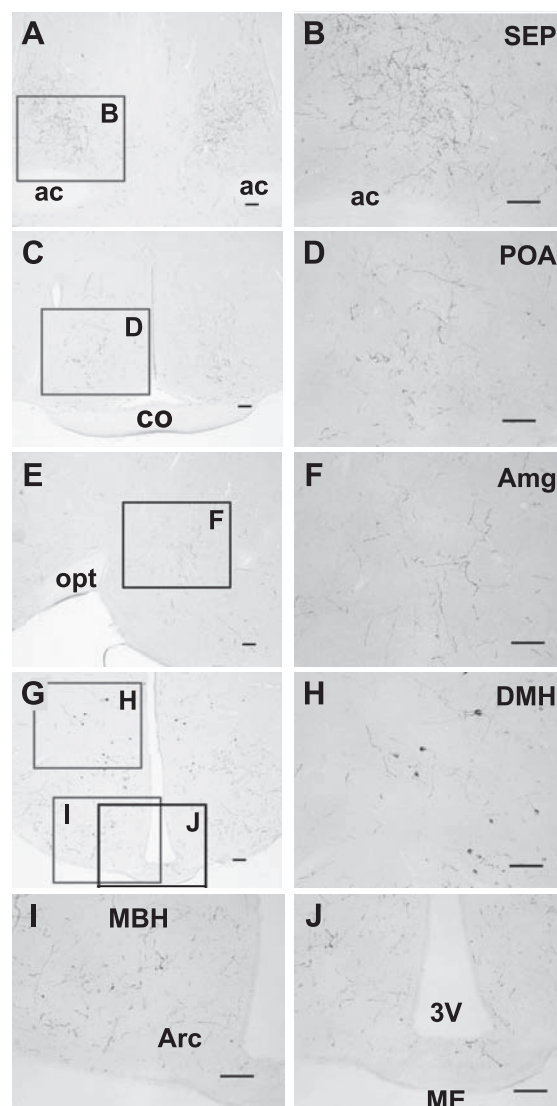


図5 光周期, メラトニン投与, 松果体除去によるGnIH免疫陽性神経線維の免疫反応性の変化  
 A, B 中隔核 (SEP). C, D 視索前核 (POA). E, F 扁桃体 (Amg). G, H 視床下部背内側領域 (DMH). G, I 視床下部内側基底核 (MBH) および弓状核 (Arc). G, J 正中隆起 (ME). スケールバーの長さは全て100  $\mu$ mを示す. K GnIH免疫陽性神経線維の免疫反応性. LD: 長日条件, MEL: メラトニン投与, SD: 短日条件, Px: 松果体除去. n=4. \*はLD群に比較して統計的有意差があることを示す ( $P < 0.05$ ).

ンをサイラスティックプレートにより13週間皮下投与したところ、GnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性が短日条件下のハムスター同様に低下した(図4 Ab, B)。一方、ハムスターを短日条件下に置く前に松果体を除去すると、GnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性は低下しなかった(図4 Ad, B)。

### GnIH免疫陽性神経線維の分布と光周期、メラトニン投与、松果体除去による免疫反応性の変化

GnIH免疫陽性神経線維は、外側中隔核(図5 A, B)、内側視索前核(図5 C, D)、扁桃核(図5 E, F)、弓状核(図5 I)に最も密に分布していた。GnIH免疫陽性神経線維は、視床室傍核、視床下部室傍核、中心灰白質にも分布していた。一方、正中隆起にも僅かであるがGnIH免疫陽性神経線維が分布していた(図5 J)。次に、GnIH免疫陽性神経線維の免疫反応性の光周期、メラトニン投与、松果体除去による影響を調べた。GnIH免疫陽性神経線維の免疫反応性はGnIH免疫陽性神経細胞体の免疫反応性と同様に、長日条件下におけるメラトニン投与(図5 K)または短日条件下(図5 K)により低下した。しかし、短日条件下でも松果体を除去するとほとんどの脳領域でGnIH免疫陽性神経線維の免疫反応性は低下しなかった(図5 K)。

### GnIH免疫陽性神経線維のGnRH免疫陽性神経細胞体への投射と光周期の影響

GnIH抗体とGnRH抗体を用いた2重免疫染色により、GnIH免疫陽性神経線維はGnRH免疫陽性神経細胞体へ投射していることが観察された(図6 A)。また、GnIH免疫陽性神経線維が投射するGnRH免疫陽性神経細胞体の割合はハムスターを13週間短日条件下に置くのと長日条件下のハムスターに比較して低下した(図6 B)。

### GnRH免疫陽性神経細胞体におけるGnIH受容体の発現

GnRH抗体とGnIH受容体に対する抗体を用いた2重免疫染色により、GnRH免疫陽性神経細胞体にはGnIH受容体が発現していることが明らかになった(図6 C-G)。

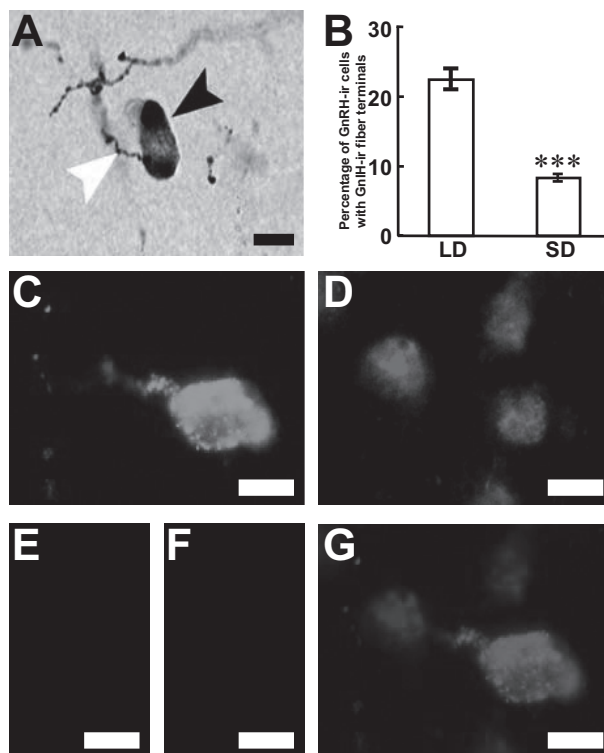


図6 A GnIH免疫陽性神経線維のGnRH免疫陽性神経細胞体への投射。白矢頭：GnIH免疫陽性神経線維、黒矢頭：GnRH免疫陽性神経細胞体。スケールバーの長さは10  $\mu$ mを示す。B 光周期によるGnIH免疫陽性神経線維が投射するGnRH免疫陽性神経細胞体の割合の変化。LD：長日条件、SD：短日条件。\*\*\*,  $P < 0.001$ 。C GnRH免疫陽性神経細胞体。D GnRH受容体の発現。E GnRH抗体を用いずに免疫染色を行った場合。F GnIH受容体に対する抗体を用いずに免疫染色を行った場合。G CとDを重ねることによりGnRH免疫陽性神経細胞体にGnIH受容体が発現していることが示された。スケールバーの長さはすべて10  $\mu$ mを示す。

### GnIH (RFRP-1とRFRP-3)の脳室投与による血中ゴナドトロピン濃度の変化

ハムスターのGnIH (ハムスターRFRP-1とRFRP-3)がゴナドトロピン放出にどのような影響を及ぼすかを調べるために、ハムスターRFRP-1とRFRP-3を長日条件下および短日条件下のハムスターの脳室に投与し、血中ゴナドトロピン(LHとFSH)濃度をEIA法により定量した。500 pmolのハムスターRFRP-1またはRFRP-3を長日条件下のハムスターの脳室に投与すると、5分後に血中LH濃度が著しく低下した(図7 A)。100 pmolのハムスターRFRP-3を長日条件下のハムスターの脳室に投与した場合には5分後に血中LH濃度が低下したが、100 pmolのハムスターRFRP-1の投与では5分後に血中LH濃度は低下しなかった(図7 A)。ハムスターRFRP-1またはRFRP-3 (500 pmolおよび100 pmol)の長日条件下のハムスターへの脳室投与30分後には血中

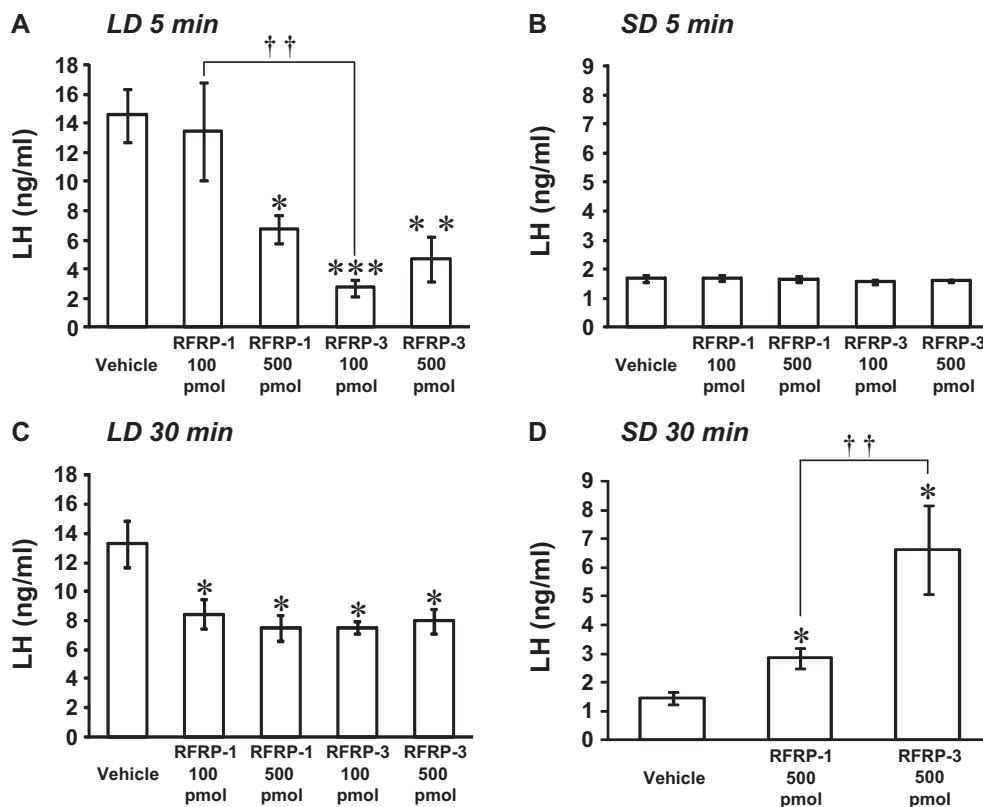


図7 ハムスター GnIH (RFRP-1と RFRP-3) の脳室投与による血中ゴナドトロピン濃度の変化  
 A 長日条件下 (LD) のハムスターの脳室にハムスター RFRP-1または RFRP-3を投与した5分後の血中 LH 濃度. B 短日条件下 (SD) のハムスターの脳室にハムスター RFRP-1または RFRP-3を投与した5分後の血中 LH 濃度. C LD のハムスターの脳室にハムスター RFRP-1または RFRP-3を投与した30分後の血中 LH 濃度. D SD のハムスターの脳室にハムスター RFRP-1または RFRP-3を投与した30分後の血中 LH 濃度. n= 4. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001 vs vehicle 投与群. ††, P<0.01.

LH 濃度が有意に低下した (図7C). 一方, ハムスター RFRP-1または RFRP-3 (500 pmol および 100 pmol) は血中 FSH 濃度を低下させなかった.

一方, 短日条件下のハムスターの脳室にハムスター RFRP-1またはハムスター RFRP-3を投与しても, 投与5分後に血中 LH 濃度に変化はなかった (図7B). しかし, ハムスター RFRP-1または RFRP-3 (500 pmol) を短日条件下のハムスターの脳室に投与すると, 30分後に血中 LH 濃度が上昇した (図7D). ハムスター RFRP-1または RFRP-3 (500 pmol) は血中 FSH 濃度を上昇させなかった.

**おわりに**

本研究では, 季節繁殖動物であるハムスターの視床下部から2種の GnIH (ハムスター RFRP-1と RFRP-3) を同定した. 成熟ペプチドの構造は, SPAPANKVPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub> (ハムスター RFRP-1) と TLSRVPSLPQRF-NH<sub>2</sub> (ハムスター RFRP-3) であった. また, ハムスター GnIH

免疫陽性神経繊維は GnRH 神経細胞体に投射し, GnRH 神経細胞体には GnIH 受容体が発現していることが明らかになった. GnIH 前駆体 mRNA や GnIH ペプチドの発現は長日条件下で高く, 短日条件下で低かった. 夜間に松果体から分泌されるホルモンであるメラトニンを長日条件下のハムスターに投与すると GnIH の発現が低下したが, 松果体を除去した短日条件下のハムスターでは GnIH の発現が低下しなかった. 同定した2種の GnIH を長日条件下のハムスターに脳室投与すると投与5分および30分後に LH の放出が抑制されたが, 短日条件下のハムスターへの脳室投与では30分後に LH の放出が促進された. 以上の結果より, ハムスターの GnIH は LH 放出を制御していることが分かった. さらに, ハムスターの GnIH の発現はメラトニンにより制御されており, 季節によって GnIH は異なる生理作用を有することが分かった [40, 41].

## 謝 辞

本研究発表の機会を与えていただきました日本生殖内分泌学会理事長 苛原 稔先生, 第17回学術集会会長 吉村泰典先生, また本誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43, 1334-1339.
- Burgus R, Butcher M, Amoss K, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R (1972) Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 278-282.
- King JA, Millar RP (1982) Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem* 257, 10722-10728.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Minegishi T, Nomura M, Takahashi Y, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1982) Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 820-827.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1984) Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 3874-3878.
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 661-667.
- Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K (2003) Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res* 312, 73-79.
- Ubuka T, Ueno M, Ukena K, Tsutsui K (2003) Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system. *J Endocrinol* 178, 311-318.
- Satake H, Hisada M, Kawada T, Minakata H, Ukena K, Tsutsui K (2001) Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* 354, 379-385.
- Osugi T, Ukena K, Bentley GE, O'Brien S, Moore IT, Wingfield JC, Tsutsui K (2004) Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J Endocrinol* 182, 33-42.
- Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K (2005) A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J Endocrinol* 184, 257-266.
- Cicccone NA, Dunn IC, Boswell T, Tsutsui K, Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ (2004) Gonadotropin inhibitory hormone depresses gonadotropin  $\alpha$  and follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit expression in the pituitary of the domestic chicken. *J Neuroendocrinol* 16, 999-1006.
- Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K (2006) Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147, 1187-1194.
- Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC (2003) Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 15, 794-802.
- Ubuka T, Kim S, Huang YC, Reid J, Jiang J, Osugi T, Chowdhury VS, Tsutsui K, Bentley GE (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 149, 268-278. Erratum in: *Endocrinology* 149, 4229.
- Tsutsui K (2009) A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol* 88, 76-88.
- Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ (2010) Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 31, 284-295.
- Tsutsui K, Ubuka T (2013) Gonadotropin-inhibitory hormone. In: Kastin AJ, Vaudry H (eds) *Handbook of biologically active peptides*. Section on brain peptides. Academic Press, London, pp. 802-811.
- Ubuka T, Lai H, Kitani M, Suzuuchi A, Pham V, Cadigan PA, Wang A, Chowdhury VS, Tsutsui K, Bentley GE (2009) Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J Comp Neurol* 517, 841-855.
- Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE (2009) Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic-pituitary axis. *PLoS One* 4, e8400.
- Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2, 703-708.
- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R (2006) Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2410-2415.
- Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS (2007) Rat RFamide-

- related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51, 171-180.
24. Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K (2008) Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 199, 105-112.
  25. Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE (2008) Potent action of RFRP-3 on pituitary gonadotropes indicative of an hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149, 5811-5821.
  26. Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook AJ, Clarke IJ (2009) Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 150, 5549-5556.
  27. Kadokawa H, Shibata M, Tanaka Y, Kojima T, Matsumoto K, Oshima K, Yamamoto N (2009) Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. *Domest Anim Endocrinol* 36, 219-224.
  28. Bronson FH (1989) *Mammalian Reproductive Biology*. Univ. of Chicago Press, Chicago.
  29. Ohta M, Kadota C, Konishi H (1989) A role of melatonin in the initial stage of photoperiodism in the Japanese quail. *Biol Reprod* 40, 935-941.
  30. Bentley GE, Van't Hof TJ, Ball GF (1999) Seasonal neuroplasticity in the songbird telencephalon: a role for melatonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4674-4679.
  31. Guyomarc'h C, Lumineau S, Vivien-Roels B, Richard J, Degnaucourt S (2001) Effect of melatonin supplementation on the sexual development in European quail (*Coturnix coturnix*). *Behav Processes* 53, 121-130.
  32. Rozenboim I, Aharony T, Yahav S (2002) The effect of melatonin administration on circulating plasma luteinizing hormone concentration in castrated White Leghorn roosters. *Poult Sci* 81, 1354-1359.
  33. Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC, Tsutsui K (2005) Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3052-3057.
  34. Chowdhury VS, Yamamoto K, Ubuka T, Bentley GE, Hattori A, Tsutsui K (2010) Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. *Endocrinology* 151, 271-280.
  35. Revel FG, Saboureaux M, Pévet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD (2008) RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149, 902-912.
  36. Mason AO, Duffy S, Zhao S, Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K, Silver R, Kriegsfeld LJ (2010) Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* 25, 176-185.
  37. Dardente H, Birnie M, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2008) RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 20, 1252-1259.
  38. Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH (1996) Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 54, 470-477.
  39. Bartness TJ, Goldman BD, Bittman EL (1991) SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 260, R102-112.
  40. Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K (2012) Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153, 373-385.
  41. Ubuka T, Son YL, Tobar Y, Tsutsui K (2012) Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 148.