

排卵を司る脳内メカニズムの最前線

井上 直子, 上野山賀久, 東村 博子

名古屋大学大学院生命農学研究科動物生殖科学

はじめに

哺乳類の生殖機能は、視床下部一下垂体—性腺軸の頂点に立つキスペプチンニューロンにより制御される。視床下部前方の前腹側室周囲核 (AVPV) / 視索前野 (POA) に局在するキスペプチンニューロンは、エストロジェンのポジティブフィードバックを仲介し、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) / 黄体形成ホルモン (LH) サージを誘起する排卵中枢であると考えられている。本稿では、哺乳類の排卵を制御する脳内メカニズムについてわれわれの最新の研究成果を含めて概説したい。

1. キスペプチン—GPR54シグナリングの発見

キスペプチン (当初はメタスチンと命名) は、2001年に武田薬品工業の大瀧らによってヒトの胎盤から発見された。大瀧らは、1996年に腫瘍転移抑制遺伝子として報告されていた *Kiss1* 遺伝子¹⁾ の転写産物であるメタスチンがオーファン受容体 GPR54 の内因性リガンドであることを明らかにした²⁾。2003年に米国とフランスの2つのグループにより、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の患者に *GPR54* 遺伝子の機能喪失型変異が報告されると、キスペプチン—GPR54シグナルの生殖機能への関与に大きな注目が集まった^{3,4)}。この突然変異を持つ患者では、ゴナドトロピン分泌が著しく減弱し、*GPR54* 変異を持たない特発性ゴナドトロピン分泌低下症の患者と比較して、外因性 GnRH への反応性が高かった⁴⁾。また、*Gpr54* ノックアウト (KO) マウスは、卵胞発育を示さず性成熟が起きなかった一方、外因性 GnRH またはゴナドトロピンの両方に反応性を示し、視床下部における GnRH レベルは正常であった⁴⁾。その後、多くの研究によって GnRH ニューロンに GPR54 が発現していること

や^{5,6)}、ラット⁷⁻⁹⁾やマウス¹⁰⁾、サル¹¹⁾などの実験動物やヤギ¹²⁾、ヒツジ¹³⁾、ウシ¹⁴⁾などの家畜、さらにはヒト¹⁵⁾において、キスペプチンが GnRH/LH の分泌を強力に促す神経ペプチドであることが示された。これらより、キスペプチンは哺乳類に共通して、生殖を第一義的に制御する神経ペプチドであることが明らかとなり、キスペプチン—GPR54シグナリングの発見は生殖内分泌分野において、GnRH の発見に次ぐパラダイムシフトをもたらした。

2. 生殖中枢として機能するキスペプチンニューロン

キスペプチンニューロンの細胞体は、主に視床下部の2つの領域、すなわち AVPV (げっ歯類) / POA (げっ歯類以外) と弓状核に局在する。これまでの膨大なキスペプチン研究の成果により、AVPV/POA のキスペプチンニューロンが GnRH/LH サージを制御する排卵中枢であり、弓状核の同ニューロンが GnRH / ゴナドトロピンパルスを制御する卵胞発育中枢であると考えられている (図1)。その根拠となった成果の一部を紹介しよう。われわれが作出した *Kiss1* KO ラットでは、LH サージおよび LH パルスは消失し、卵巣では3次卵胞以降の発育卵胞が認められずに不妊を呈する¹⁶⁾。また、両神経核のキスペプチンニューロンには、エストロジェン受容体 α (ER α) が発現しており^{8,17,18)}、AVPV/POA キスペプチンニューロンでは、エストロジェンによって *Kiss1* 発現が促進され、同ニューロンが活性化される^{17,19,20)}。このため、AVPV/POA キスペプチンニューロンは、エストロジェンのポジティブフィードバックを仲介し、GnRH/LH サージを誘起する排卵中枢として機能すると考えられる。一方、弓状核キスペプチンニューロンでは、エストロジェンにより *Kiss1* 発現が抑制される^{8,17,21)}。また、*Kiss1*-floxed ラットを作出し、アデノ随伴ウイルスにより Cre 組み換え酵素を強制発現させ、弓状核においてのみ *Kiss1* 遺伝子発現を欠損させると、AVPV キスペプチンニューロンが残存していても、LH パルスが消失した²²⁾。これらの結果から、弓状核の同ニューロンは、エ

連絡先：井上直子 名古屋大学大学院生命農学研究科
動物生殖科学
〒464-0814 愛知県名古屋市中種区不老町
TEL : 052-789-4074
FAX : 052-789-4072
E-mail : ninoue@agr.nagoya-u.ac.jp

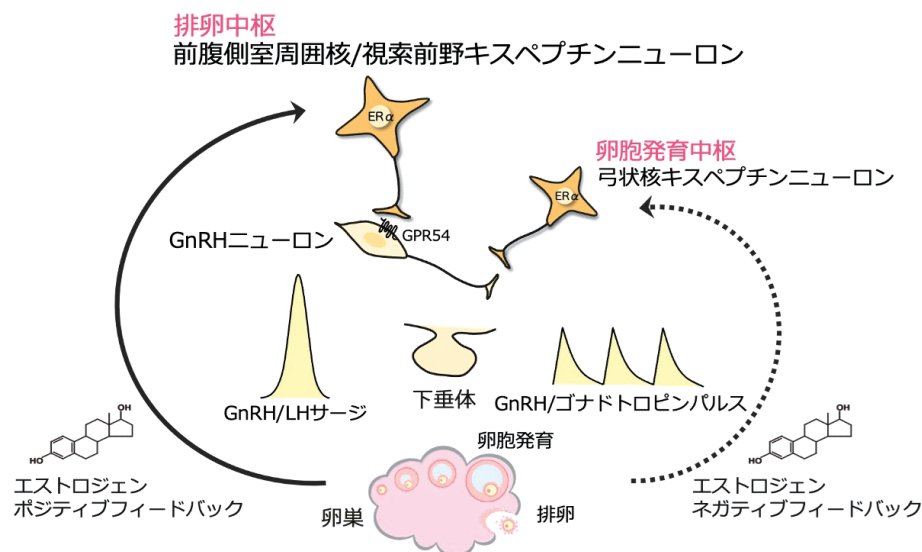


図1 生殖中枢として機能するキスペプチンニューロン
キスペプチンニューロンは、前腹側室周囲核（げっ歯類）／視索前野（POA、げっ歯類以外）と弓状核に局在する。AVPV/POA キスペプチンニューロンは、排卵中枢として機能する。卵胞が十分に发育して血中のエストロゲン濃度が高まると、エストロゲンのポジティブフィードバック作用により、AVPV/POA のキスペプチンニューロンにおけるキスペプチン遺伝子発現の上昇と同ニューロンの活性化が促され、GnRH/LH サージが起こり、排卵が生じる。一方、弓状核キスペプチンニューロンは、GnRH／ゴナドトロピンパルスを制御する卵胞发育中枢として機能する。发育中の卵胞から分泌される低レベルのエストロゲンのネガティブフィードバック作用は、弓状核キスペプチンニューロンを介して GnRH/LH のパルスを微調整することで、卵胞を適正に发育させる。

ストロジェンのネガティブフィードバックを仲介し、GnRH/LH パルスを調節する卵胞发育中枢として機能すると考えられる。興味深いことに、弓状核の *Kiss1* 遺伝子発現を欠損させたラット（すなわち AVPV の *Kiss1* 遺伝子は残存）に卵巣除去後に発情前期レベルのエストラジオールを代償投与（発情前期モデル）すると、LH サージを誘起できることから²²⁾、AVPV キスペプチンニューロンが GnRH/LH サージを制御する排卵中枢として機能することを証明することができた。

3. エストロゲンによる *Kiss1* 発現制御の分子メカニズム

われわれは、エストロゲンによる AVPV *Kiss1* 発現の亢進が、*Kiss1* プロモーター領域のヒストンアセチル化によって制御されることを明らかにした²³⁾。マウスの AVPV 組織を用いて、アセチル化ヒストン H3 抗体や E α 抗体による ChIP アッセイを行ったところ、卵巣除去群に比べて発情前期モデルにおいて、*Kiss1* プロモーター領域におけるヒストン H3 アセチル化が有意に促進され、*Kiss1* プロモーター領域における E α 結合が促進された。一方、マウス弓状核組織においては、発情前期モデルにおける *Kiss1* プロモーター領域におけるヒスト

ン H3 アセチル化が卵巣除去群と比べて有意に抑制され、*Kiss1* プロモーター領域における E α 結合も抑制された。さらに、通常 *Kiss1* を発現しないマウス視床下部由来不死化細胞株（N6）において、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A を添加したところ、*Kiss1* 発現が誘起された。これらの一連の結果から、*Kiss1* プロモーターにおけるエストロゲン依存的ヒストン H3 の活性化修飾が、AVPV *Kiss1* の発現誘導をもたらすことを示唆した。また、われわれは遺伝子改変マウスによる *in vivo* レポーターアッセイにより、*Kiss1* 遺伝子座 3' 領域に、AVPV における *Kiss1* 発現を制御するエンハンサーが存在することを明らかにした²³⁾。*Kiss1* 遺伝子座周辺領域におけるエピジェネティック修飾に伴うクロマチン構造の変化を Chromosome Conformation Capture (3C) 法で解析したところ、エストロゲン存在下で 3' エンハンサー領域が *Kiss1* プロモーター領域に接近することを見いだした。これらにより、エストロゲンが *Kiss1* プロモーター領域において、E α のリクルートとヒストンアセチル化を誘導するとともに、プロモーター領域とエンハンサー領域とのクロマチンループの形成を促進することで、AVPV *Kiss1* 発現を誘起することが示唆された。現在われわれは、*Kiss1* の転写を調節する E α 転写共役因子の同定に取り組んでおり、近い将

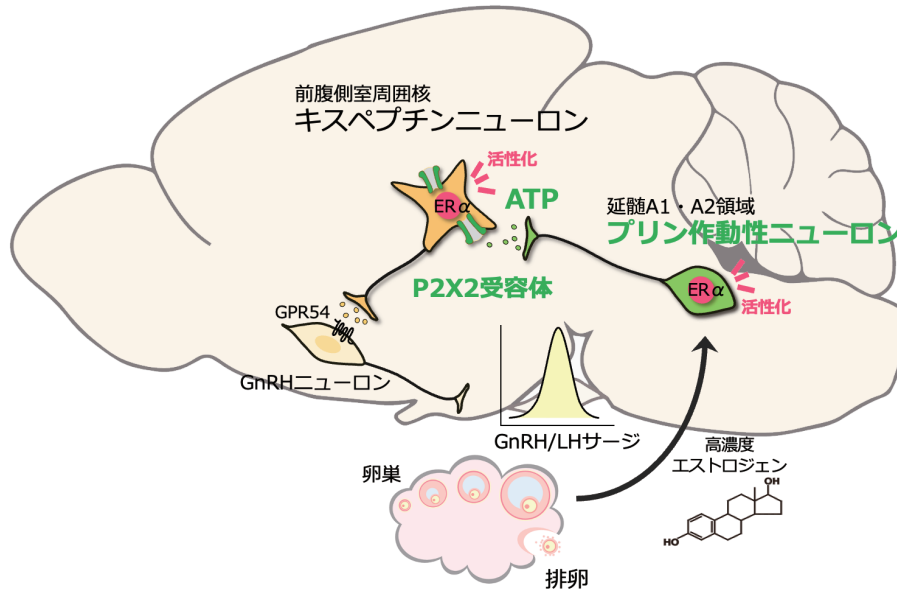


図2 プリン作動性ニューロンによるキスペプチンニューロン活性化と排卵誘起

ラットにおいて、卵胞が十分に成熟し血中エストロゲン濃度が高くなると（発情前期レベルエストロゲン）、エストロゲン受容体 α を介して延髄A1およびA2領域のプリン作動性ニューロンが活性化され、神経伝達物質として終末から放出されたATPが、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのP2X2受容体を介して同ニューロンを活性化し、GnRH/LHサージ分泌、ひいては排卵を誘起すると考えられる。

来、エストロゲンによる視床下部の両キスペプチンニューロンにおける *Kiss1* 発現調節メカニズムの全容を解明したいと考えている。

4. アデノシン三リン酸（ATP）による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

AVPV/POA キスペプチンニューロンが活性化するには、エストロゲンによって *Kiss1* 発現が亢進するだけでなく、上位からの興奮性シグナルの入力が必要であると考えられる。なぜなら、卵巣除去ラットに発情前期レベルの高濃度エストロゲンまたは発情休止期レベルの低濃度エストロゲンのいずれを投与しても同レベルの *Kiss1* 発現が誘起される一方、LHサージは発情前期レベルのエストロゲン存在下においてのみ誘起されるからである¹⁷⁾。

われわれは最近、プリン作動性神経が、エストロゲンによるAVPVキスペプチンニューロンの活性化を担う上位ニューロンであることを明らかにした²⁴⁾。まず、ラットキスペプチン蛍光可視化細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い²⁵⁾、細胞の興奮に関与する受容体を探索したところ、興奮性イオンチャネルの一つであるプリン受容体（P2X2受容体）がAVPVの *Kiss1* 発現細胞にのみ高く発現することを見いだした²⁴⁾。ATPは、一

般に細胞内のエネルギー通貨として知られるが、脳内ではプリン作動性ニューロンから分泌される神経伝達物質としても機能している。そこで、発情前期ラットのAVPVキスペプチンニューロン近傍にプリン受容体（P2X受容体）拮抗剤であるPPADSを投与した結果、対照群と比較してLHサージが著しく抑制されるとともに、排卵された卵子の数が有意に減少した。さらに、発情前期モデルラットのAVPVにPPADSを投与したところ、LHサージが完全に消失した。加えて、発情前期モデルラットのAVPVキスペプチンニューロン近傍にATPを投与すると、すぐさまLHサージ様の分泌が誘起された一方で、*Kiss1* KOラットにATPを投与してもLHサージを誘起できなかった。これらの結果は、ATPが、AVPVキスペプチンニューロンを介してLHサージとそれに引き続く排卵を促すことを示唆している。

続いて、発情前期レベルのエストロゲンがP2X2受容体やプリン作動性ニューロンに及ぼす影響を免疫組織化学により検討したところ、発情前期モデルラットでは、AVPVキスペプチンニューロンにおけるP2X2受容体発現が発情休止期モデルに比べて増加していた。また、AVPVキスペプチンニューロン近傍に投射するプリン作動性ニューロンの線維がエストロゲン処置により増加した一方で、GnRHニューロン近傍には、プリン作動性ニューロンの投射はほとんど見られなかった。

さらに、キスペプチンニューロンを活性化させるプリン作動性ニューロンの起始核を組織学的に検討したところ、発情前期モデルラットの延髄 A1 および A2 領域では、c-Fos タンパク（神経活性化マーカー）を共発現するプリン作動性ニューロンが発情休止期モデルラットと比較して有意に増加することが明らかになった。また、延髄 A1 および A2 領域のプリン作動性ニューロンの一部は ERa を発現し、さらに AVPV キスペプチンニューロンの近傍に投射していることを見いだした。これらのことから、発情前期レベルのエストロジェンがラット後脳の延髄 A1 および A2 プリン作動性ニューロンの活動を刺激し、放出された ATP が AVPV キスペプチンニューロンを興奮させ GnRH/LH サージ、ひいては排卵を引き起こすことが示唆された（図 2）。

5. 嗅覚刺激による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

他個体からの嗅覚刺激は、性成熟、性周期、排卵などの生殖機能を調節することが知られている。メスのラット²⁶⁾ やヤギ²⁷⁾、ヒツジ²⁸⁾ では、オス由来の嗅覚刺激により LH サージが増強されることが報告されており、これはオスの存在下での排卵をより確実にするための生殖戦略の一つと考えられる。われわれは、オスラット由来の嗅覚刺激がメスラット AVPV のキスペプチンニューロンを活性化することで、LH サージが増強することを示した²⁹⁾。具体的な実験内容をご紹介します。オスラットを 1 週間飼育したケージからオスラットを取り除いた後、同ケージへ発情前期モデルメスラットを一時間導入した群（オス床敷曝露群）と、未使用の床敷きケージに発情前期モデルメスラットを一時間導入した群（未使用床敷曝露対照群）を比較した。その結果、オス床敷曝露群の AVPV において c-Fos を共発現したキスペプチンニューロンが、未使用床敷曝露対照群と比較して有意に増加した。また、オス床敷曝露開始直後より、メスラットにおける血中 LH 濃度が増加し、LH サージのピーク値は未使用床敷曝露対照群と比べ有意に高かった。これらより、オスラット由来の嗅覚刺激は、メスラット AVPV キスペプチンニューロンを活性化させることにより GnRH/LH サージを増強することを示した。

主嗅覚系や鋤鼻系の嗅覚情報を仲介する神経シグナルは、分界条床核、扁桃体皮質核、扁桃体内側核などの大脳辺縁系で中継され、視床下部に入力すると考えられる。オス床敷曝露群では、対照群と比較して分界条床核、扁桃体皮質核、および扁桃体内側核における c-Fos 発現細

胞数が有意に増加した。このことは、オスラット由来の嗅覚シグナルが、大脳辺縁系を經由して AVPV キスペプチンニューロンを活性化する可能性を示唆している。すなわち、AVPV キスペプチンニューロンは、これらの大脳辺縁系ニューロンからの情報を統合して、GnRH/LH サージ、ひいては排卵を制御すると考えられる。

6. 交尾刺激による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

哺乳類は交尾の有無によらず排卵を周期的に繰り返す自然排卵動物と、オスと交尾した場合にのみ排卵する交尾排卵動物に分類される。ラットやマウス、ウシやブタ、ヒトを含む自然排卵動物では、性成熟を迎えるとオスとの交尾なしで、卵胞の成熟、排卵が周期的に生じる。一方、スunks (*Suncus murinus*) やウサギなどの交尾排卵動物は、交尾刺激によってのみ排卵するので発情周期を示さない。これは、限られた交尾の機会を逃さず妊娠を成功させるための交尾排卵動物特有の生殖戦略である。われわれはスunks において、オスからの交尾刺激がメスの POA キスペプチンニューロンを活性化することを明らかにし³⁰⁾、キスペプチンニューロンが交尾排卵動物でも排卵を制御することを突き止め、大きな反響を得た。

まず、スunks の *Kiss1* 遺伝子をクローニングし、視床下部における *Kiss1* 発現を組織学的に検討したところ、他の動物と類似して、POA および弓状核に *Kiss1* 発現細胞が局在していた。さらに、エストロジェンによって POA では *Kiss1* 発現が促進し、弓状核では抑制されたことから、スunks においても POA キスペプチンニューロンがエストロジェンのポジティブフィードバックを仲介する排卵中枢として機能していることが示唆された。そこで、合成したスunks キスペプチンをメスunks の皮下に単回投与したところ、交尾刺激がなくても排卵が誘起された。また、このキスペプチン投与による排卵誘起効果が、GnRH 受容体拮抗剤の前投与でまったく見られなくなったことから、スunks においてもキスペプチンが GnRH 放出を刺激し、ひいては排卵を誘起することを示唆した。続いて、オスからの交尾刺激によって、キスペプチンニューロンが活性化するかどうかを免疫組織化学により検討したところ、未交尾のスunks では POA キスペプチンニューロンに c-Fos の共発現はほとんど認められなかったが、オスと交尾したスunks において、c-Fos を共発現する POA キスペプチンニューロンが有意に増加した。一方で、弓状核キスペ

チンニューロンではこのような変化は見られなかった。これらの結果により、スunksにおいて交尾刺激は、POAキスペプチンニューロンを活性化させることによってGnRH分泌を刺激することが示唆された。すなわち、交尾排卵動物においてもPOAキスペプチンニューロンは、卵巣由来の血中エストロゲンレベルと交尾刺激に由来する神経情報を統合して、GnRH/LHサージ、ひいては排卵を制御すると考えられる。

終わりに

このように哺乳類では、AVPV/POAキスペプチンニューロンがエストロゲンに加えてさまざまな神経シグナルを統合することで、GnRH/LHサージ、ひいては排卵を制御している。現在は、われわれの研究室で独自に得た*Kiss1*-Cre遺伝子改変ラットを駆使し、AVPV/POAキスペプチンニューロンの活性化を制御するさらなる神経シグナルの同定や、エストロゲンが*Kiss1*発現を促進する細胞内メカニズムの解明に取り組んでいる。これらの研究を通して、排卵を司る脳内メカニズムの全容解明に迫りたいと考えている。また、これらの基礎的知見が、医療や畜産現場における排卵障害の原因解明や排卵促進技術開発に資することを願っている。

引用文献

1. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88, 1731-1737.
2. 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 (2001) Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613-617.
3. De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10972-10976.
4. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MBL, Crowley WF, Aparicio SAJR, Colledge WH (2003) The GPR 54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349, 1614-1627.
5. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80, 264-272.
6. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SAJR (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1761-1766.
7. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T (2004) Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 383-388.
8. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431-4436.
9. Pheng V, Uenoyama Y, Homma T, Inamoto Y, Takase K, Yoshizawa-Kumagaye K, Isaka S, Watanabe TX, Ohkura S, Tomikawa J, Maeda KI, Tsukamura H (2009) 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.
10. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073-4077.
11. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR 54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2129-2134.
12. Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H (2009) Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol*, 21, 813-821.
13. Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ (2007) Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148, 5258-5267.
14. Naniwa Y, Nakatsukasa K, Setsuda S, Oishi S, Fujii N, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Ohkura S (2013) Effects of full-length kisspeptin administration on follicular development in Japanese black beef cows. *J Reprod Dev*, 59, 588-594.
15. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 6609-6615.
16. Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H (2015) Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinising hor-

- mone release in *KissI* knockout rats. *J Neuroendocrinol*, 27, 187–197.
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 KI (2007) 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.
18. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*, 401, 225–230.
19. Watanabe Y, Uenoyama Y, Suzuki J, Takase K, Suetomi Y, Ohkura S, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H (2014) Oestrogen-induced activation of preoptic kisspeptin neurons may be involved in the luteinising hormone surge in male and female Japanese monkeys. *J Neuroendocrinol*, 26, 909–917.
20. Matsuda F, Nakatsukasa K, Suetomi Y, Naniwa Y, Ito D, Inoue N, Wakabayashi Y, Okamura H, Maeda KI, Uenoyama Y, Tsukamura H, Ohkura S (2015) The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol*, 27, 57–65.
21. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H (2021) Kisspeptin neurons and estrogen-estrogen receptor α signaling: Unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. *Int J Mol Sci*, 22, 9229.
22. Nagae M, Uenoyama Y, Okamoto S, Tsuchida H, Ikegami K, Goto T, Majarune S, Nakamura S, Sanbo M, Hirabayashi M, Kobayashi K, Inoue N, Tsukamura H (2021) Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator. *Proc Natl Acad Sci*, 118, e2009156118.
23. Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K-i., Tsukamura H (2012) Epigenetic regulation of *KissI* gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E1294–E1301.
24. Inoue N, Hazim S, Tsuchida H, Dohi Y, Ishigaki R, Takahashi A, Otsuka Y, Yamada K, Uenoyama Y, Tsukamura H (2023) Hindbrain adenosine 5-triphosphate (ATP)-purinergic signaling triggers LH surge and ovulation via activation of AVPV kisspeptin neurons in rats. *J Neurosci*, 43, JN-RM-1496–22.
25. Assadullah, Ieda N, Kawai N, Ishii H, Ihara K, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H (2018) Co-expression of the calcitonin receptor gene in the hypothalamic kisspeptin neurons in female rats. *Reprod Med Biol*, 17, 164–172.
26. Beltramino C, Taleisnik S (1983) Release of LH in the female rat by olfactory stimuli: Effect of the removal of the vomeronasal organs or lesioning of the accessory olfactory bulbs. *Neuroendocrinology*, 36, 53–58.
27. Chemineau P (1987) Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats—a review. *Livest Prod Sci*, 17, 135–147.
28. Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT (1986) The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—A review. *Livest Prod Sci*, 15, 219–247.
29. Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Inoue N (2017) Enhancement of the luteinising hormone surge by male olfactory signals is associated with anteroventral periventricular *KissI* cell activation in female rats. *J Neuroendocrinol*, 29, 1–9.
30. Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H (2011) Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). *Proc Natl Acad Sci*, 108, 17527–17532.