

Note

절식이 나일 틸라피아 *Oreochromis niloticus*의 Kiss2, GnRH I mRNA
발현 및 성 스테로이드 호르몬 농도에 미치는 영향

박진우¹ · 권준영² · 진예화² · 오승용^{3*}

¹한국해양과학기술원 생태기반연구센터
(15627) 경기도 안산시 상록구 해안로 787
²선문대학교 건강보건대학 수산생명의학과
(31466) 충청남도 아산시 탕정면 선문로 221
³한국해양과학기술원 통영해상과학기지
(15627) 경기도 안산시 상록구 해안로 787

Effects of Fasting on Brain Expression of Kiss2 and GnRH I and Plasma Levels
of Sex Steroid Hormones, in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*

Jin Woo Park¹, Joon Yeong Kwon², Ye Hwa Jin², and Sung-Yong Oh^{3*}

¹Marine Ecosystem and Biological Research Center, KIOST
Ansan 15627, Korea

²Department of Aquatic Life Medical Sciences, College of Health Science, Sunmoon University
Asan 31466, Korea

³Tongyeong Marine Science Station, KIOST
Ansan 15627, Korea

Abstract : In many fish species, including Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), gonadal development occurs at the expense of stored energy and nutrients. Therefore, reproductive systems are inhibited by limited food supply. It has been well established that reproductive function is highly sensitive to both metabolic status and energy balance. Nothing is known about the possible mediated connection between energy balance and reproduction. Kisspeptin, a neuropeptide product of the Kiss gene has emerged as an essential gatekeeper of reproduction and may be possibly be linked to energy balance and reproduction in non-mammalians. Thus, in this study, the effect of fasting (10 days) on the expression of kisspeptin and the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene were assessed in Nile tilapia (male and female) using qRT-PCR. In addition, plasma levels of estradiol-17 β (E₂) and 11-ketotestosterone (11-KT) in adult tilapia were measured by ELISA. In male tilapia, fasting reduced Kiss2 and GnRH I mRNA expression in the brain and 11-KT level in comparison with the fed tilapia ($p < 0.05$). In females, however, there were no significant differences in GnRH I mRNA expression and E₂ between fish subjected to fasting and those fed ($p > 0.05$). These data indicate the impact of nutritional states on kisspeptin as a potential regulatory mechanism for the control of reproduction in male Nile tilapia.

Key words : *Oreochromis niloticus*, Kiss2, GnRH I, sex steroid hormone, fasting

*Corresponding author. E-mail : syoh@kiost.ac.kr

1. 서 론

어류를 포함한 척추동물의 번식은 환경변화(온도, 광주기 등)에 반응한 각 어체 뇌의 시상하부가 Gonadotropin-Releasing Hormone(GnRH)를 분비함으로써 조절된다. 시상하부(hypothalamus)에서 분비된 GnRH는 뇌하수체 전엽(anterior pituitary)에 위치한 GnRH 수용체를 활성화시키고, 두 종류의 서로 다른 gonadotropin(GTH)인 Follicle Stimulating Hormone(FSH)과 Luteinizing Hormone(LH)의 분비를 조절함으로써 생식소 발달 및 성숙에 관여한다. 이러한 성 성숙 과정은 체성장(somatic growth)에 이용되던 에너지가 생식소 발달 및 번식 활동을 위해 소비되는 생리학적인 과정으로(Taranger et al. 2010) 상당한 에너지가 요구된다. 따라서 풍부한 먹이 공급은 성 성숙을 유도할 수 있는 반면, 먹이 공급이 원활하지 않은 경우 성 성숙을 방해할 수 있다(Schneider 2004).

에너지 항상성(homeostasis)과 번식과의 관계는 다양한 척추동물에서 입증되었다(Mircea et al. 2007). 암컷 쥐(rats)는 단기간 절식에 의해 LH의 맥동적(pulsatile) 분비가 억제되었고(Cagampang et al. 1991; Kohsaka et al. 2001), 미성숙한 암컷 쥐에서 장기간 절식은 성 성숙개시를 방해하였다(Castellano et al. 2005). 어류의 경우 절식은 제브라피쉬(zebra fish, *Danio rerio*)의 GnRH II mRNA 발현을 감소시켰다(Nishiguchi et al. 2012). 이렇듯 먹이는 번식 활성화에 관여하는 주요한 외부요인으로 작용하며, 번식 활성화와 먹이와의 상호영향은 신경내분비시스템에 의해 조절되어질 가능성이 높다(Hoskins et al. 2008). 그러나 먹이 섭취와 GnRH 분비 사이에 존재하는 신호의 전달경로는 확실하지 않다.

최근 번식 신경내분비 연구에서 kisspeptin이 주목을 받고 있다. Kisspeptin은 Kiss 유전자의 세포내 translation에 의해 만들어지는 peptide이다. 이들은 처음에는 전이가 일어나지 않는 암세포 집단에서 발견되었다(Lee et al. 1996). 이후 kisspeptin은 다수의 어류와 포유류에서 그 구조가 밝혀졌으며 기능에 대한 다양한 연구가 진행되었다. 그 결과 경골어류를 포함한 다양한 척추동물의 GnRH, GTH 유전자(FSH β and LH β) 발현상승 및 GTH의 방출을 자극하는 강력한 조절자임이 밝혀졌다(Biran et al. 2008; Filby et al. 2008; Felip et al. 2009; Kitahashi et al. 2009; Lee et al. 2009; Li et al. 2009).

포유류의 연구에서는 추가적으로 kisspeptin이 영양과 대사 등 중요한 생물학적 기능들과 관련되어 있음이 확인되면서(Messenger et al. 2005; Patterson et al. 2006; Dhillon et al. 2007; Roa and Tena-Sempere 2007), 먹이 활동과 번식 활성화의 연결고리로서 작용할 가능성이 있다고 보고했다(Popa et al. 2008). 실제로 포유류에 대한 몇몇 연구

는 극심한 절식이 시상하부의 Kiss1 유전자의 발현을 감소시켰다(Castellano et al. 2005; Iwasa et al. 2010). 이와 같은 연구 결과들은 kisspeptin이 먹이 활동에 의해 조절되며 이를 통해 번식활성에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 그러나 지금까지 연구결과들은 절식이 번식활성에 미치는 영향이나 또는 절식이 kisspeptin 유전자 발현에 미치는 영향들을 따로 따로 연구한 것들이어서, 절식→kisspeptin→GnRH→sex steroid로 이어지는 연결 과정을 한 번에 설명하지 못하였다. 또한 어류의 경우에는 번식 활동에 주요한 역할을 하는 kisspeptin과 먹이 활동의 연관성은 명확히 밝혀지지 않아 연구의 필요성이 제기된다.

따라서 본 연구에서는 하등 척추동물의 연구를 위한 실험어종으로 널리 사용되어지는 나일 틸라피아(Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)를 이용하여 절식에 따른 시상하부 Kiss2와 GnRH I 유전자 발현 변화 그리고 혈중 성 스테로이드 호르몬의 변화를 함께 조사하였다.

2. 재료 및 방법

실험어

실험어는 수온 27±1°C, 광주기 14L:10D 조건의 순환 여과시스템에서 사육된 나일 틸라피아 성어(암: 전장 14.1±0.9 cm, 체중 56.7±7.4 g, 수: 전장 14.4±1.4 cm, 체중 55.4±7.6 g)를 사용하였다. 암·수 나일 틸라피아 모두 성적 성숙이 이루어진 개체들(암컷=20, 수컷=20)을 사용하였다. 먹이는 1일 2회 상업용 부상사료(단백질 함량 38%, Woosung, Korea)를 실험 전까지 만복으로 공급하였다.

절식실험

암컷과 수컷을 각각 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 먹이 공급 후 10일 동안 절식시켰다. 10일 동안 절식한 암컷(6마리)과 수컷(5마리)에서 뇌하수체를 포함한 뇌 조직을 적출하였다. 다른 한 그룹은 1일 2회 상업용 배합사료를 만복으로 10일 동안 공급하고, 먹이 공급 10일째 암컷과 수컷 각각 6마리씩 뇌하수체를 포함한 뇌 조직을 적출하여 절식한 개체와 비교하였다.

모든 실험어의 뇌 조직은 실험어를 benzocaine(50 ppm)에 마취하여 적출하였으며, total RNA를 추출하기 위해 추출 전까지 -70°C에서 보관하였다. 또한 암컷의 혈장 내 estradiol-17 β (E₂)와 수컷의 혈장 내 11-ketotestosterone(11-KT)를 조사하기 위해 뇌 조직 적출 전에 heparin sodium 처리 주사기(1 mL)를 사용하여 미부혈관에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 혈장을 얻기 위해 원심분리(4°C에서 1000×g로 30분간) 하였다. 얻어진 혈장은 분석 전

까지 -70°C 에서 보관하였다. 실험기간 동안 실험어는 순환여과시스템에서 수온 $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주기 14L:10D 조건 아래 사육하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA는 TRI reagent[®](Molecular Research Center Inc., USA)를 사용하여 추출하였다. 적출한 뇌를 50 mL conical tube에 넣고, 1 mL의 TRI reagent를 넣어 homogenizer(T 10, IKA, China)를 이용하여 얼음 위에서 조직을 분쇄하였다. 조직의 분쇄 후 실온에서 5분간 방치하였다. 그 다음, chloroform(Sigma. Inc., USA) 200 μL 을 첨가하여 강하게 vortexing한 후, 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 후 4°C 에서 $12,000 \times g$ 로 15분간 원심분리하고, RNA가 포함된 aqueous phase를 잘 건어내어 새 튜브에 옮겼다. RNA가 들어있는 새 튜브에 300 μL 의 isopropanol(Sigma. Inc., USA)을 넣고, inverting 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 그 다음 4°C 에서 $12,000 \times g$ 로 8분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻어내고 상층액을 제거 후 wash과정을 거쳐 total RNA를 얻었다. 추출한 total RNA는 RQ1 RNase-free DNase(Promega, USA)로 처리하여 genomic DNA에 의한 오염가능성을 최소화하였다. 이 total RNA (1 μg)와 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase(Promega, USA), oligo (dT)₁₅ primer(Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

절식 후 GnRH I 및 Kiss2 mRNA 발현량 조사

뇌 조직에서 GnRH I과 Kiss2 유전자 발현량을 알아보기 위해 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)을 실시하였다. 실험에 사용된 Kiss2, GnRH I, GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) 유전자 primer는 Beacon Designer software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 제작하였다(Table 1).

qRT-PCR 반응은 Topreal[™] qPCR 2X PreMIX SYBR Green(Enzynomics, Korea)을 이용하여 분석하였다. 반응액은 5 μL 의 cDNA(1:50 dilution)를 주형으로 사용하고,

7.5 μL Topreal[™] qPCR 2X PreMIX SYBR Green, 250 nM primer sets 그리고 N.F.W(Nuclease-free water)를 혼합하여 총 15 μL 의 volume으로 실시하였다. qRT-PCR의 수행은 CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 95°C 에서 15분간 initial denaturation하였으며, 95°C 에서 15초 denaturation, 60°C 에서 15초 annealing, 72°C 에서 30초 elongation하여 45 cycles을 반응시켜 주었다. 반응이 끝난 후에는 melting curve를 분석하였다.

GAPDH를 대조유전자로 사용하였으며, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법(Livak and Schmittgen 2001)을 이용하여 상대 정량하였다. 모든 샘플은 2회 이상 반복 측정하였다.

절식 후 혈중 E₂ 및 11-KT 농도 조사

절식에 따른 성어 암컷(6마리) 혈장 내 E₂와 수컷(5-6마리) 혈장 내 11-KT 변화를 조사하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. E₂는 어류 E₂ ELISA kit(CUSABIO, China)를 사용하여 경쟁적 ELISA법(competitive inhibition technique)으로 측정하였고, 11-KT는 어류 11-KT ELISA kit(MyBioSource, USA)를 사용하여 이중항체 샌드위치 ELISA법(double antibody sandwich technique)으로 측정하였다. E₂와 11-KT 실험은 각 제조회사에서 제공한 실험방법에 따라 진행하였으며, E₂와 11-KT 모두 EMax Endpoint ELISA Microplate Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정된 흡광도 값과 SOFTmax Pro 4.0 software(Molecular Devices)에서 만들어진 logistic(log-log) curve-fit standard curve를 사용하여 E₂와 11-KT의 농도를 계산하였다.

통계처리

각 실험결과로부터 얻어진 자료 값(mean \pm S.E.M.) 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계패키지(version 18.0)을 이용하여 절식그룹과 먹이 섭취 그룹 간에 independent t-test($p < 0.05$)로 검정하였다.

Table 1. List of Primers used for quantitative real-time PCR analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)	T _m ($^{\circ}\text{C}$)
Kiss2 F	5'-TGG GAA ACG CTA CAA TGG-3'	82	60
Kiss2 R	5'-GAA CAG AGA GAA GGG TGA AA-3'		
GnRH I F	5'-CTC GCA GGG ACG GTG TTT-3'	70	60
GnRH I R	5'-TCT TCC CTC CTG GGG TCA GT-3'		
GAPDH F	5'-TTA AGG AAG CCG TCA AGA AG-3'	126	60
GAPDH R	5'-CAG CAC CAG CAT CAA AGA-3'		

F: forward, R: reverse

3. 결과 및 고찰

본 연구 결과에서는 절식이 일부 나일 틸라피아의 번식 관련 인자들에게 영향을 줄 수 있음을 나타내었다. 수컷의 경우 GnRH 및 Kiss2 유전자 모두 절식한 그룹이 먹이를 섭취한 그룹에 비해 유의하게 낮은 발현량을 나타내었으며, 두 그룹 간 발현량의 차이는 약 5배 정도였다 (Fig. 1). 또한 수컷의 혈중 11-KT도 절식한 그룹(5.6 ± 0.6 pg/mL)이 먹이를 섭취한 그룹(9.8 ± 1.1 pg/mL)에 비해 농도가 유의하게 낮았다 (Fig. 3). 먹이 섭취와 GnRH와의 관련성은 몇몇 척추동물에서 연구가 진행되었다. 절식은 수컷 쥐의 GnRH 발현량을 감소시켰고 (Gruenewald et al. 1993), 어류의 경우 절식은 가자미 (winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*)의 GnRH II 유전자 발현을 감소시켰다 (Tuziak and Volkoff 2013). 이와는 반대로 지속적인 먹이 섭취는 미성숙한 쥐와 어린 양 (lams)의 GnRH 분비를 촉진시켜 일시적으로 LH를 상승시켰다 (Bronson 1986; Sisk et al. 1986; Foster et al. 1989). 또한 포유류의 연구에서는 대사신호와 관련한 주요 호르몬인 leptin과 insulin을 투여했을 때 GnRH mRNA가 증가해 먹이 섭취 조절에 의해 발생하는 대사신호들이 직접적으

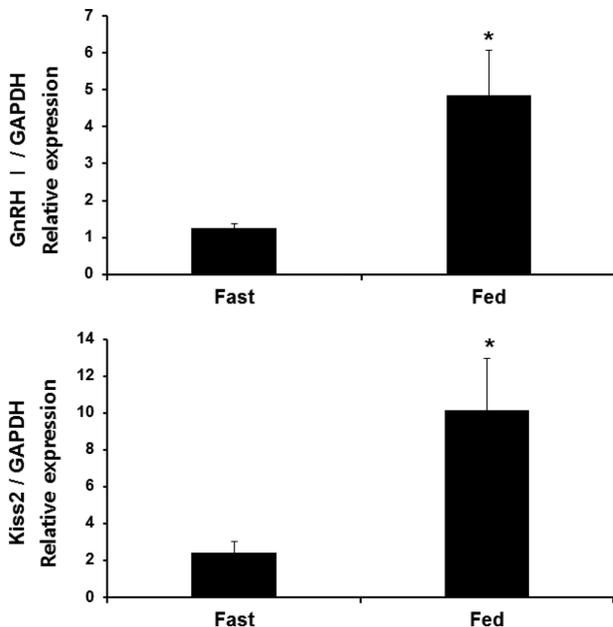


Fig. 1. Effects of fasting on the expression levels of GnRH I and Kiss2 mRNA in the brain of male Nile tilapia. Relative abundance of the mRNAs was normalized to the amount of GAPDH by the comparative threshold cycle method using qRT-PCR. Results are means \pm S.E.M. (n=5-6). * indicates significant difference from fast group ($p < 0.05$)

로 시상하부의 GnRH mRNA에 영향을 줄 수 있다고 제안했다 (Burcelin et al. 2003). 앞선 연구 결과들은 GnRH가 먹이 섭취와 밀접한 관련성이 존재함을 시사한다. 이러한 관점에서 볼 때 나일 틸라피아의 감소된 GnRH 유전자 발현량은 절식에 영향을 받았을 가능성이 있으며, 이로 인해 GnRH에 영향을 받아 성적 성숙을 촉진시키는 11-KT

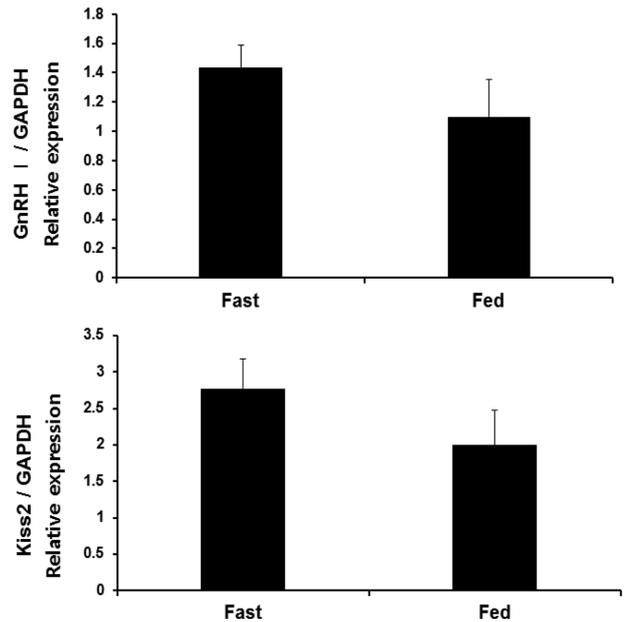


Fig. 2. Effects of fasting on the expression levels of GnRH I and Kiss2 mRNA in the brain of female Nile tilapia. Relative abundance of the mRNAs was normalized to the amount of GAPDH by the comparative threshold cycle method using qRT-PCR. Results are means \pm S.E.M. (n = 6)

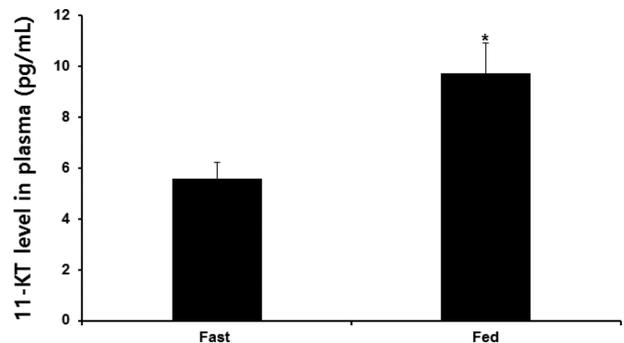


Fig. 3. Effects of fasting on the plasma level of 11-KT in male Nile tilapia. 11-KT level was read at 450 nm and calculated using logistic (log-log) curve-fit standard curve ($R^2 > 0.99$) which were generated by SOFTmax pro. Results are means \pm S.E.M. (n = 5-6). * indicates significant difference from fast group ($p < 0.05$)

의 농도도 감소했을 것으로 사료된다.

Kisspeptin은 어류를 포함한 척추동물에서 GnRH neuron을 자극하여 성 성숙에 관여한다고 알려져 있다(Parhar et al. 2004). 이와 같이 어류의 kisspeptin 연구는 대부분 번식에 초점이 맞춰져 있어 먹이 섭취와의 관련성은 명확하게 밝혀진 바가 없다. 그러나 몇몇 포유류의 연구에서는 kisspeptin과 먹이 섭취와의 관련성을 제시했다. 성숙한 암컷 쥐의 Kiss1 유전자 발현은 18시간 절식으로 인해 감소되었으며(Brown et al. 2008), 또 다른 쥐의 연구에서는 절식이 kisspeptin 수용체 유전자의 발현을 감소시킨다고 보고했다(Luque et al. 2007).

추가적으로 포유류에서는 kisspeptin이 먹이 섭취와 관련한 호르몬들과 관련성이 있다고 보고하였다. 식욕증진(orexigenic) 호르몬 중 하나인 ghrelin은 위(stomach)(Sakata et al. 2002)와 뇌(Cowley 2003)에서 합성되며, 포유류의 먹이 섭취 증가와 에너지 항상성을 조절하는 인자로 알려져 있다(Nakazato et al. 2001; Horvath et al. 2003; Wren et al. 2001). 이와 같은 ghrelin을 쥐의 정맥(intravenous) 내 투여 시 뇌의 Kiss1 유전자 발현을 감소시킨다고(Forbes et al. 2009) 보고해 대사신호와 kisspeptin과의 관련성을 암시했다. 포유류의 연구결과를 바탕으로 어류의 먹이 섭취와 kisspeptin의 관계를 명확히 설명할 수는 없다. 그러나 어류에서도 포유류의 식욕조절(appetite-regulating)에 상응(homologous)하는 몇몇의 peptide들이 발견되어(Volkoff et al. 2005) 적어도 어류의 먹이 섭취에 관여하는 주요 구성요소는 척추동물의 진화 과정에서 비교적 잘 보존되었음을 시사했다(Mechaly et al. 2011). 앞서 언급했던 ghrelin도 틸라피아(Parhar et al. 2003)를 포함한 금붕어(goldfish, *Carassius auratus*)(Unniappan et al. 2002) 등 몇몇의 어류에서 발견되었으며, 어류의 뇌와 위에서 발현하였다(Kaiya et al. 2003a, 2003b; Unniappan et al. 2002). 따라서 절식으로 인한 틸라피아 수컷에서 Kiss2 유전자 발현의 감소는 포유류의 kisspeptin처럼 섭식상태에 영향을 받아 감소했을 가능성이 제기된다.

나일 틸라피아 암컷은 다회산란(multiple spawning)하며 구중부화하는 어종(mouth breeders)이다. 구중부화하는 어종들은 수정된 알을 자신의 구강에서 부화시키기 때문에 몇 주 동안 먹이 섭취를 거의 하지 못한다. 암컷은 구중부화 후 체중이 감소하고, 난소주기(ovarian cycles)와 다음 산란시기가 지연된다(Smith and Wootton 1994, 1995; Tacon 1996). 그러나 본 연구에서 나일 틸라피아 암컷의 경우 번식활동에 관여하는 유전자인 GnRH와 Kiss2 모두 절식에 의한 영향을 받지 않았다(Fig. 2). 두 유전자 모두 앞선 수컷과는 반대로 먹이를 섭취한 그룹보다 절식

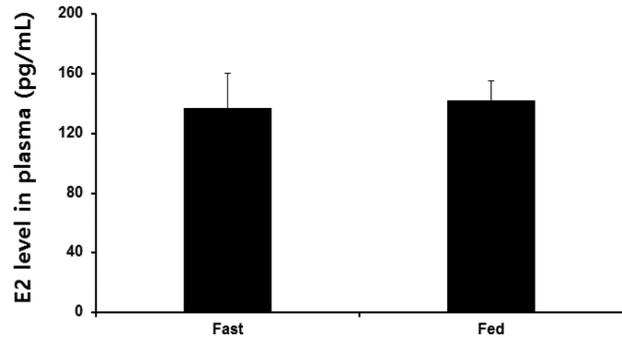


Fig. 4. Effects of fasting on the plasma level of E₂ in female Nile tilapia. E₂ level was read at 450 nm and calculated using logistic (log-log) curve-fit standard curve ($R^2 > 0.99$) which were generated by SOFTmax pro. Results are means \pm S.E.M. (n = 6)

한 그룹에서 약간 높은 발현양상을 나타내었지만 두 그룹 간의 유의한 차이는 없었다. 또한 암컷의 혈장 내 E₂의 농도도 절식한 그룹에서 136.9 \pm 23.27 pg/mL, 먹이를 섭취한 그룹에서는 142 \pm 13.1 pg/mL로 비슷한 수준을 나타내면서 10일 동안의 절식에 영향을 받지 않았음을 확인하였다(Fig. 4). 이와 같이 수컷과 다른 결과는 성별에 따른 차이에 기인할 수도 있지만, 구중부화를 위해 수 주간 절식을 하는 나일 틸라피아 암컷을 대상으로 절식에 의한 영향을 확인하기에는 절식기간이 짧았을 가능성이 있다. 실제로 구중부화를 하는 암컷 african cichlid fish(*Astatotilapia burtoni*)의 경우 4주 동안 절식 후에 GnRH 유전자 발현과 혈장 내 E₂의 농도가 감소되었다(Grone et al. 2012). 이는 암컷 나일 틸라피어도 절식이 번식관련 인자들에 영향을 줄 수 있음을 간접적으로 나타내는 결과이며, 절식기간을 늘리는 등의 추가적인 실험을 통해 조사해 볼 필요가 있다.

앞선 결과들을 종합해 볼 때 비록 암컷에서는 절식에 의한 영향을 확인하지 못하였지만, 수컷의 경우 절식이 kisspeptin을 포함한 번식관련 인자들에게 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 또한 절식에 의해 동반 감소된 수컷의 kisspeptin과 GnRH 유전자 발현양상으로 미루어 볼 때, kisspeptin이 나일 틸라피아 수컷의 먹이 섭취와 GnRH를 매개할 가능성이 있다. 그러나 두 유전자는 ghrelin, leptin, insulin 등 먹이 섭취와 관련한 인자들에게 각각 영향을 받을 가능성이 존재한다. 따라서 절식 \rightarrow 시상하부(kisspeptin \rightarrow GnRH) \rightarrow 생식소(sex steroid)로 이어지는 연결 과정을 보다 명확히 밝히기 위해서는 먹이 섭취와 관련한 인자들과의 관련성을 조사하는 추가적인 연구가 요구된다.

사 사

이 논문은 2010년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2010-0024441).

참고문헌

- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B (2008) Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol Reprod* **79**:776–786
- Bronson FH (1986) Food-restricted, prepubertal, female rats: rapid recovery of luteinizing hormone pulsing with excess food, and full recovery of pubertal development with gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **118**:2483–2487
- Brown RE, Imran SA, Ur E, Wilkinson M (2008) KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol* **281**:64–72
- Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP (2003) Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurones: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology* **144**:4484–4491
- Cagampang FR, Maeda KI, Tsukamura H, Ohkura S, Ota K (1991) Involvement of ovarian steroids and endogenous opioids in the fasting-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *J Endocrinol* **129**:321–328
- Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M (2005) Change in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**:3917–3925
- Cowley MA (2003) Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol* **480**:3–11
- Dhillon WS, Murphy KG, Bloom SR (2007) The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human. *Rev Endocr Metab Dis* **8**:41–46
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A (2009) Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol* **312**:61–71
- Filby AL, van Aerle R, Duitman J, Tyler CR (2008) The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biol Reprod* **78**:278–289
- Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K (2009) Effects of ghrelin on kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett* **460**:143–147
- Foster DL, Ebling FJ, Micka AF, Vannerson LA, Bucholtz DC, Wood RI (1989) Metabolic interfaces between growth and reproduction. I. Nutritional modulation of gonadotropin, prolactin, and growth hormone secretion in the growth-limited female lamb. *Endocrinology* **125**:342–50
- Grono BP, Carpenter RE, Lee M, Maruska KP, Fernald RD (2012) Food deprivation explains effects of mouthbrooding on ovaries and steroid hormones, but not brain neuropeptide and receptor mRNAs, in an African cichlid fish. *Horm Behav* **62**:18–26
- Gruenewald DA, Matsumoto AM (1993) Reduced gonadotropin-releasing hormone gene expression with fasting in male rat brain. *Endocrinology* **132**:480–482
- Horvath TL, Castaneda T, Tang-Christensen M, Pagotto U, Tschöp MH (2003) Ghrelin as a potential anti-obesity target. *Curr Pharm Design* **9**:1383–1395
- Hoskins LJ, Xu M, Volkoff H (2008) Interactions between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and orexin in the regulation of feeding and reproduction in goldfish (*Carassius auratus*). *Horm Behav* **54**:379–385
- Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Fujisawa S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M (2010) Sensitivities of mRNA expression levels of Kiss1 and its receptor, Kiss1r, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *J Endocrinol* **207**:195–202
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawachi H, Kangawa K (2003a) Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology* **144**:5215–5226
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K (2003b) Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol* **176**:415–423
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS (2009) Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* **150**:821–831
- Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Suda T, Schiöth HB (2001) A significant participation of orexin-A, a potent

- orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surge in the rat. *Brain Res* **898**:166–170
- 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 I* **88**:1731–1737
- Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki MN, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY (2009) Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* **150**:2837–2846
- Li S, Zhang Y, Liu Y, Huang X, Huang W, Lu D, Zhu P, Shi Y, Cheng CHK, Liu X, Lin H (2009) Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* **201**:407–418
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**:402–408
- Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M (2007) Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using models and a cell line. *Endocrinology* **148**:4601–4611
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F (2011) Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. *Mol Cell Endocrinol* **339**:14–24
- Messenger S, Chatzidakis EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *P Natl Acad Sci USA* **102**:1761–1766
- Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA (2007) Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can* **29**:887–902
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**:194–198
- Nishiguchi R, Azuma M, Yokobori E, Uchiyama M, Matsuda K (2012) Gonadotropin-releasing hormone 2 suppresses food intake in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front Endocrinol* **3**:122
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* **145**:3613–3618
- Parhar IS, Sato H, Sakuma Y (2003) Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun* **305**:169–175
- Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR (2006) Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* **18**:349–354
- Popa SM, Clifton DK, Steiner RA (2008) The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol* **70**:213–238
- Roa J, Tena-Sempere M (2007) KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocr* **153**:132–140
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* **23**:531–536
- Schneider JE (2004) Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* **81**:289–317
- Sisk CL, Bronson FH (1986) Effects of food restriction and restoration on gonadotropin and growth hormone secretion in immature male rats. *Biol Reprod* **35**:554–561
- Smith C, Wootton RJ (1994) The cost of parental care in *Haplochromis argens* (Cichlidae). *Environ Biol Fish* **40**:99–104
- Smith C, Wootton RJ (1995) The costs of parental care in teleost fishes. *Rev Fish Biol Fisher* **5**:7–22
- Tacon P (1996) Relationships between the expression of maternal behaviour and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **146**:261–275
- Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien F-A, Dufour S, Karlsen O, Norberg B, Andersson E, Hansen T (2010) Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocr* **165**:483–515
- Tuziak SM, Volkoff H (2013) Gonadotrophin-releasing hormone in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): molecular characterization, distribution and effects of fasting. *Gen Comp Endocr* **184**:9–21
- Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, Peter RE (2002) Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* **143**:4143–4146
- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerda-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE (2005) Neuropeptides

and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocr* **142**:3–19

Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin causes hyperphagia and

obesity in rats. *Diabetes* **50**:2540–2547

Received Sep. 7, 2015

Revised Nov. 18, 2015

Accepted Feb. 25, 2016