

Kisspeptin-10 の成熟雌牛の黄体形成ホルモン および卵胞刺激ホルモン放出作用

後藤由希・斉藤隼人・金 金・平田統一・澤井 健・橋爪 力*

岩手大学農学部

岩手県盛岡市上田 3-18-8 〒020-8550

2011年12月2日受付, 2012年1月17日受理

要 約

本研究は成熟雌牛における Kisspeptin-10 (Kp10: キスペプチンの生理活性部位である 10 個のアミノ酸残基からなるペプチド) の性腺刺激ホルモン (GTH) 放出作用を明らかにするために, 経産牛 5 頭および未経産牛 5 頭に Kp10 を投与して黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) の放出反応を調べた。プロジェステロン (P₄) 放出腔内留置製剤 (CIDR) を 7 日間腔内に挿入し CIDR 除去日 (Day 0) および除去 2 日目 (Day 2) に Kp10 (5 μg/生体重 kg) を静脈内に投与して血中 LH および FSH 濃度の変化を調べた。CIDR 除去時における血中 P₄ 濃度は経産牛 (平均値 ± 標準誤差: 2.09 ± 0.30 ng/ml) と未経産牛 (2.29 ± 0.49 ng/ml) とともに Day 2 (0.31 ± 0.06 および 0.35 ± 0.04 ng/ml) に比べ有意に高かった (P<0.05)。Kp10 を経産牛に投与すると投与後 10 分間で血中 LH 濃度が有意に上昇し, 投与後 30 分間 (Day 0: 1.12 ± 0.25 ~ 1.42 ± 0.17 ng/ml) および 40 分間 (Day 2: 1.10 ± 0.17 ~ 1.29 ± 0.15 ng/ml) まで投与前の値 (Day 0: 0.58 ± 0.04 ng/ml, Day 2: 0.63 ± 0.05 ng/ml) に比べ有意に高い値を示した (P<0.05)。Kp10 を未経産牛に投与しても経産牛と同様に血中 LH 濃度は有意に上昇した (P<0.05)。Kp10 投与による LH 放出作用には経産, 未経産および P₄ 濃度による有意な差は見られなかった。血中 FSH 濃度は Kp10 の投与では経産牛および未経産牛とも有意な変化は見られなかったが, Kp10 の投与により上昇する傾向が見られた。本研究の結果は Kp10 が P₄ 濃度に関わらず, 経産牛および未経産牛の LH を放出させることを示し, 雌牛における Kp10 を介した新しい生殖生理機構の一端を明らかにした。
キーワード: LH, Kisspeptin-10, 経産牛, FSH, 未経産牛

東北畜産学会報 61(3): 47～54 2012

緒 言

Kisspeptin (キスペプチン) は *Kiss-1* 遺伝子により産生されるアミノ酸残基 10～54 個のフラグメントからなる新規ペプチドである (Kotani ら, 2001; Caraty と Franceschini, 2008; Gottsch ら, 2009)。視床下部で産生されたキスペプチンは, 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンに働き, 下垂体からの黄体形成ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) を放出させること (Gottsch ら, 2006; Smith ら, 2006a; Caraty と Franceschini, 2008) が最近多くの動物種

で明らかになってきている。家畜では羊 (Caraty ら, 2007; Smith ら, 2007; Smith, 2009), 山羊 (Hashizume ら, 2010; Saito ら, 2011), 豚 (Lents ら, 2008) および牛 (Kadokawa ら, 2008; Whitlock ら, 2008; Ezzat ら, 2009) で, キスペプチンを中枢や末梢に投与すると LH や FSH が放出されることが報告されている。しかし, 牛へのキスペプチン投与においては, 春機発動期前の 7 ヶ月齢の雌牛 (Kadokawa ら, 2008), 4～6 ヶ月齢の雌雄子牛 (Ezzat ら, 2009), 卵巣除去された成熟雌牛 (Whitlock ら, 2008) での結果が報告されているだけで, まだその作用機序は良く分かっていない。また卵巣が機能している成熟雌牛での性腺刺激ホルモン (GTH) 放出作用はまだ検討されていない。今まで GTH 放出の制御は直接牛に GnRH を投与して行われてきたが, キスペプチンは GnRH ニューロンを介し GTH を放出させる

* 連絡者: 橋爪 力 (はしづめ つとむ)
(岩手大学農学部)

〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8
Tel. 019-621-6161 Fax. 019-621-6161
E-mail: hashi@iwate-u.ac.jp

ので、キスペプチンによる GTH 放出作用を成熟牛で明らかにすることは、臨床面からのみならず生殖生理学上からも大変興味深い研究課題である。

本研究は、卵巣が機能する月齢にある成熟雌牛における Kisspeptin-10 (Kp10: キスペプチンの生理活性部位である 10 個のアミノ酸残基からなるペプチド) の GTH 放出作用を調べることを目的とした。雌牛は経産牛と未経産牛を用いその放出反応差を比較した。また本研究では、成熟雌牛の発情周期に伴う血中プロジェステロン (P_4) 濃度差による影響を除外するために P_4 放出腔内留置製剤 (CIDR) を用いて血中 P_4 濃度を調整して、血中 P_4 濃度の高い時期と低い時期に Kp10 を投与してそれぞれの時期における LH および FSH 放出作用を調べた。

材料および方法

本研究における動物実験は岩手大学動物実験委員会の承認 (A200906) を得て行われた。

1. Kisspeptin-10

ヒト Kisspeptin-10 (Kp10; YNWNFSGLRF-NH₂) を Fmoc 法によりペプチド合成機 (島津 PSSM-8, 島津製作所, 京都) を用いて合成し, C18 カラムを使用した HPLC で精製した。Kp10 の投与量は 5 μ g/ 生体重 kg で静脈内に投与した (Ezzat ら, 2009; Hashizume ら, 2010; Saito ら, 2011)。

2. 供試牛

供試牛は黒毛和種経産牛 5 頭 (月齢: 49.7 \pm 3.1 ヶ月 (平均値 \pm 標準誤差), 体重: 492.6 \pm 47.9kg) と未経産牛 5 頭 (月齢: 11.8 \pm 0.8 ヶ月, 体重: 347.3 \pm 12.4kg) で、それぞれ供試前に発情を確認している牛を用いた。経産牛の産歴は 2.8 \pm 0.2 産で、最終分娩後 65.4 \pm 2.3 日経過していた。供試牛は岩手大学附属御明神牧場内の畜舎で終日群飼したが、採血時には 1 頭ずつスタンションに繋養した。牛には

乾草と濃厚飼料を給与したが、採血時には飲水のみとし、採血終了後に給餌した。実験は 2010 年 5 月に行った。供試牛には P_4 放出腔内留置製剤 CIDR (シダー 1900, ファイザー株式会社, 東京) を 7 日間挿入し, CIDR 抜去時にクロプロステノールとして 500 μ g の PGF_{2 α} 類似体 (ダルマジン, 共立製薬株式会社, 東京) を筋肉内注射した (Fig. 1)。

3. Kp10 投与と採血

Kp10 (5 μ g/ 生体重 kg) は 2 ml の生理食塩水で溶解し, CIDR 抜去 0 日 (Day 0) および 2 日目 (Day 2) の 15:00 に外頸静脈カテーテルより投与した (Fig. 1)。血液は頸静脈カテーテルより、投与前 60 分間は 20 分間隔 (14:00 ~ 15:00), 投与後 60 分間 (15:00 ~ 16:00) および投与後 60 ~ 120 分間 (16:00 ~ 17:00) はそれぞれ 10 分間隔および 20 分間隔で採取した。CIDR 抜去と PGF_{2 α} の投与は最終血液採取後に行った (17:00)。1 回の採血量は 5 ml で、予め 50 μ g のヘパリンカルシウム (30 IU/ 試験管) を滴下しておいたガラス試験管内に採取した。血液は 3000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 下で 30 分間遠心分離し、血漿を分離した。血漿は LH, FSH および P_4 濃度を測定するまで -30 $^{\circ}$ C で保存した。

4. ホルモン濃度の測定

血漿中の P_4 濃度は、ジエチルエーテルで抽出したのち、Horse Radish Peroxydase (HRP) で標識した P_4 を用いたエンザイム免疫アッセイにより測定した (Prakash ら, 1987)。標識ホルモンと標準ホルモンには Progesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime (SIGMA, U.S.A.) を用いた。測定可能な最小濃度は 0.08 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 9.27% であった。血漿中の LH および FSH 濃度は、ラジオ免疫アッセイにより測定した (Kanematsu ら, 1990; Hashizume ら, 1999)。LH の測定では標識ホルモンおよび標準ホルモンに USDA-bLH-B-6 を用いた。測定可能な最小濃度は 0.14 ng/ml で、アッセイ内変動係数は

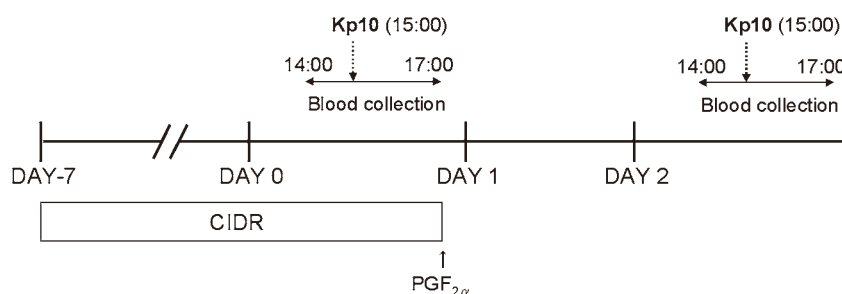


Fig. 1. Schematic illustration of time course for the treatment of controlled internal progesterone releasing device (CIDR) and intravenous (i.v.) injections of PGF_{2 α} and Kisspeptin-10 (Kp10) (5 μ g/kg BW) in this experiment.

6.46%であった。FSHの測定では標識ホルモンと標準ホルモンにそれぞれAFP5318CおよびAFP5346Dを用いた。測定可能な最小濃度は0.27 ng/mlで、アッセイ内変動係数は11.5%であった。血漿中 P_4 、LHおよびFSH濃度の測定はすべて1回のアッセイで行った。

5. データ分析

得られた結果は、すべて平均値 ± 標準誤差で表した。血漿中 P_4 濃度の各間の比較、Kp10の投与前と投与後のLHおよびFSH濃度の比較はOne-way repeated measures ANOVAで分散分析した後、各間の有意差をNewman-Keulsを用いて検定した。また、Day 0とDay 2のKp10投与後60分間のLH放出面積(AUC)の差はStudentの*t*-検定を用いて検定した。すべてのデータはGraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.)を用いて解析した。危険率5%以下を有意差として表した。

結果

1. 経産牛と未経産牛におけるDay 0およびDay 2の血中 P_4 濃度

経産牛と未経産牛におけるDay 0およびDay 2のKp10投与直前(15:00)の血中 P_4 濃度をFig. 2に示した。Day 0およびDay 2の経産牛と未経産の血中 P_4 濃度には有意差は見られなかったが、Day 0における血中 P_4 濃度は経産牛(2.09 ± 0.30 ng/ml)と未経産牛(2.29 ± 0.49 ng/ml)ともDay 2(0.31 ± 0.06 および 0.35 ± 0.04 ng/ml)に比べ有意に高かった($P < 0.05$)。

2. 経産牛におけるKp10投与後の血中LHおよびFSH濃度の変化

Day 0とDay 2にKp10を経産牛に投与した時の血中

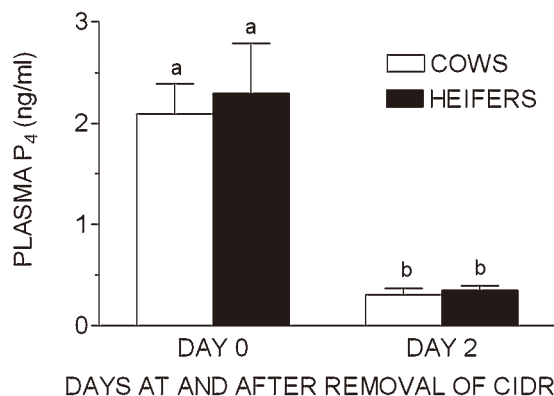


Fig. 2. Plasma progesterone (P_4) concentrations at the CIDR's removal (day 0) and 2 days later (day 2) in cows and heifers. Each value represents the mean \pm SE for 5 animals. Different letters (a and b) on the bar denote significant differences ($P < 0.05$).

LH濃度の変化をFig. 3に示した。Day 0とDay 2ともKp10投与後、LH濃度の有意な上昇が見られた。Day 0

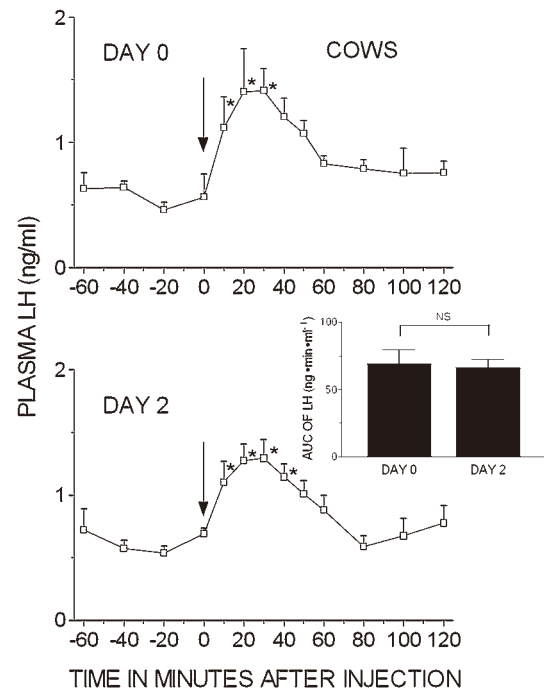


Fig. 3. Plasma concentrations of luteinizing hormone (LH) in response to i.v. injections of Kp10 (5 μ g/kg BW) on day 0 and day 2 in cows. Note that the area under the LH response curve (AUC) for the 60-min period after treatment on day 0 and day 2 is also indicated in the figure. Arrows indicate the time of injection (0 min). Each value represents the mean \pm SE for 5 animals. * $P < 0.05$ compared with the mean of pre-injection values.

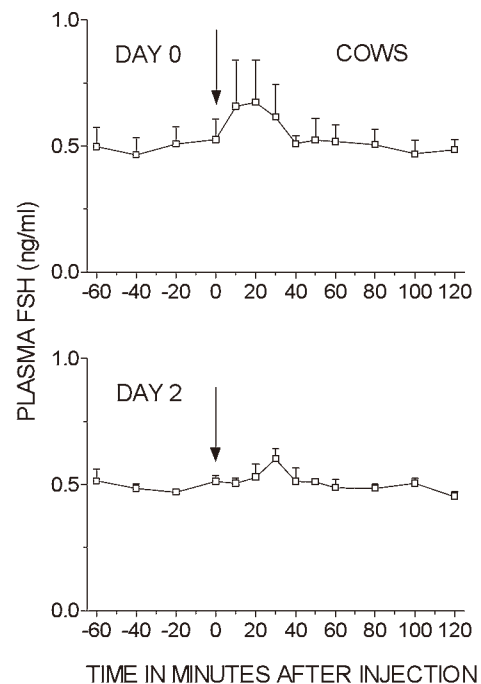


Fig. 4. Plasma concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) in response to i.v. injections of Kp10 (5 μ g/kg BW) on day 0 and day 2 in cows. Arrows indicate the time of injection (0 min). Each value represents the mean \pm SE for 5 animals.

では投与後 10～30 分間の LH 濃度は投与前の値 (0.58 ± 0.04 ng/ml) に比べ有意に高く、投与後 30 分間でピーク値 (1.42 ± 0.17 ng/ml) が見られた ($P < 0.05$)。Day 2 の LH 放出反応は Day 0 とほぼ同様で、Kp10 投与後 10～40 分間の LH 濃度は投与前の値 (0.63 ± 0.04 ng/ml) に比べ有意に高く、投与後 30 分間でピーク (1.29 ± 0.15 ng/ml) が見られた ($P < 0.05$)。投与後 60 分間内の AUC には Day 0 および Day 2 の間で有意差は見られなかった。Kp10 投与後の FSH 濃度は、Day 0 および Day 2 とも投与前に比べ高くなる傾向が見られた (Fig. 4)。

3. 未経産牛における Kp10 投与後の血中 LH および FSH 濃度の変化

Day 0 と Day 2 に Kp10 を未経産牛に投与した時の血中 LH 濃度の変化を Fig. 5 に示した。Day 0 と Day 2 とも Kp10 投与後、LH 濃度の有意な上昇が見られた。Day 0 では投与後 10～30 分間の LH 濃度は投与前の値 (0.46 ± 0.04 ng/ml) に比べ有意に高く、投与後 20 分間でピーク値 (1.04 ± 0.19 ng/ml) が見られた ($P < 0.05$)。Day 2 の LH 放出反応は Day 0 とほぼ同様で、Kp10 投与後 10～30 分間の LH 濃度は投与前の値 (0.65 ± 0.05 ng/ml) に比べて有意に高く、投与後 20 分間でピーク (1.40 ± 0.22 ng/ml) が見られた ($P < 0.05$)。投与後 60 分間内の AUC には Day 0 および Day 2 の間で有意差は見られなかった。

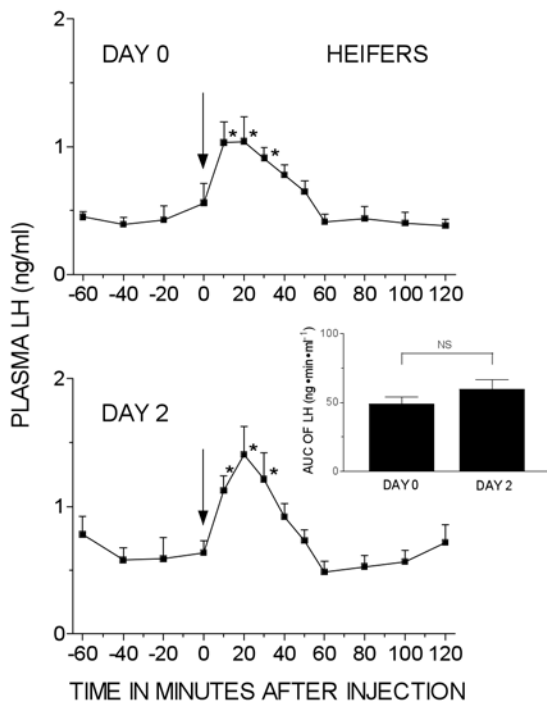


Fig. 5. Plasma concentrations of LH in response to i.v. injection of Kp10 (5 μ g/kg BW) on day 0 and day 2 in heifers. Note that the AUC of LH for the 60-min period after treatment on day 0 and day 2 is also indicated in the figure. Arrows indicate the time of injection (0 min). Each value represents the mean \pm SE for 5 animals. * $P < 0.05$ compared with the mean of pre-injection values.

は Day 0 および Day 2 の間で有意差は見られなかった。Kp10 投与後の FSH 濃度は、Day 0 および Day 2 とも投与前に比べ高くなる傾向が見られた (Fig. 6)。

経産牛と未経産牛の Kp10 投与後の LH および FSH 放出反応には有意差は見られなかった。

考 察

Kp10 の GTH 放出作用は牛においては、春機発動期前の 7 ヶ月齢の雌牛 (Kadokawa ら, 2008), 4～6 ヶ月齢の雌雄子牛 (Ezzat ら, 2009), 卵巣除去された成熟雌牛 (Whitlock ら, 2008) で報告されているだけで、卵巣が機能している成熟雌牛での反応はまだ検討されていない。本研究では CIDR により発情周期を調整した経産牛および未経産牛においても、Kp10 は LH を放出させること、また LH のように明瞭ではないが FSH も上昇する傾向が見られることを初めて明らかにした。また、本研究の結果は Kp10 が P_4 濃度に関わらず経産牛および未経産牛の LH を放出させることも示し、 P_4 による GnRH 分泌の抑制がある状態でも Kp10 は GnRH を介して GTH 分泌刺激作用を有していることが示唆された。

Kp10 を経産牛の静脈内に投与すると Day 0 および Day 2 とも LH 濃度は急激に上昇し、投与後 10～30 分間で投与前の値に比べ有意に高い値を示した。また、Kp10 を未経産牛に投与すると経産牛と同様に LH 濃度は上昇し、投

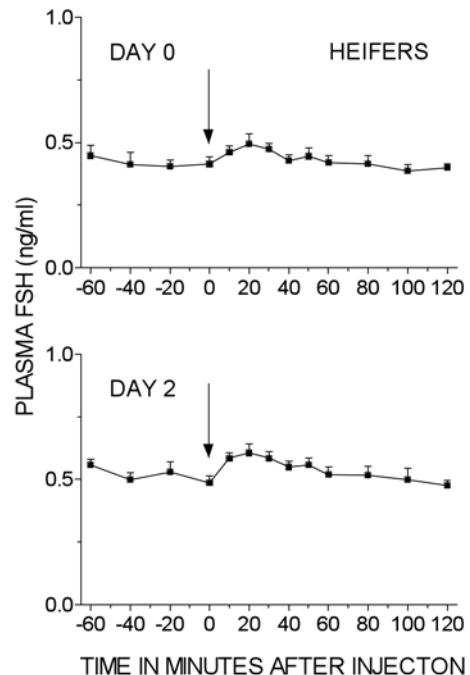


Fig. 6. Plasma concentrations of FSH in response to i.v. injection of Kp10 (5 μ g/kg BW) on day 0 and day 2 in heifers. Arrows indicate the time of injection (0 min). Each value represents the mean \pm SE for 5 animals.

与後10～40分間で投与前に比べ有意に高い濃度を示し、経産牛と未経産牛のLH放出反応には有意差は見られなかった。このように、本研究の結果から成熟後の雌牛では経産牛と未経産牛でKp10によるLH放出作用には明瞭な差が見られないことが分かった。

本研究の結果を春機発動期前の雌牛の結果 (Ezzat ら, 2009) と比較すると、Kp10投与後のLH放出の推移には差は見られないが、ピーク時のLH濃度は経産牛と未経産牛とも春機発動期前の雌牛 (7.2 ± 1.2 ng/ml) に比べ低いことがわかった。ラット (Han ら, 2005) や雌羊 (Caraty ら, 2007) ではKp10のLH放出作用は春機発動期に比べ成熟後は低くなることや、卵巣除去した成熟雌牛においてはKp10によるLH放出反応は春機発動期前の雌子牛の約1/20であること (Whitlock ら, 2008) から、牛においても性成熟に達するとKp10によるLH放出反応は低くなることを示唆された。キスペプチンはGnRHニューロンを介してGTHを放出させること (Gottsch ら, 2006; Smith ら, 2006a; Caraty と Franceschini, 2008)、ラットでは春機発動期前にGnRH受容体mRNAの発現が高まること (Zapatero-Caballero ら, 2003, 2004) から、牛においても春機発動期前にはGnRH受容体の発現が高いのかもしれない。性成熟後の牛でKp10によるLH放出反応が低くなることに関しては今後さらに検討する必要がある。

本研究では発情周期における性ステロイドホルモンの影響を考慮しCIDRにより発情周期を調節し、異なるP₄濃度下においてKp10をそれぞれ投与した。Day 0のP₄濃度はDay 2に比べ有意に高かったが、Kp10投与によるLH放出反応は経産牛および未経産牛とも有意な変化は見られなかった。ラット、マウス、雌羊において、卵巣除去すると弓状核 (ARC) のKiss1 mRNAの発現が増加し、エストラジオール処置により元に戻ることを報告されている (Smith ら, 2005, 2006b, 2007; Maeda ら, 2007)。また、雌ラットとマウスにおいて卵巣除去すると前腹側室周囲核 (AVPV) のKiss1 mRNAの発現が減少し、エストラジオール処置によって元に戻ることも報告されている (Smith ら, 2005; Maeda ら, 2007)。これらの神経核にはGnRHニューロンが存在すること (Clarkson と Herbison, 2006)、またキスペプチンの受容体であるGPR54はGnRHニューロンにも発現すること (Irwig ら, 2004; Han ら, 2005; Smith, 2009) などからKiss1 mRNAの発現とGTH分泌は性ステロイドの影響を受けることが考えられる。しかし、本実験のP₄濃度の作用範囲内では、Kp10のLH放出作用に及ぼすP₄の影響は明らかでなかった。

本研究では、Kp10投与による有意なFSH放出作用は見られなかったが、Kp10の投与によりFSHは上昇する傾向にあった。Kp10をラットの中枢に投与すると有意な

FSH放出反応が見られるが、その反応はLHの約1/100である (Navarro ら, 2005)。また、著者らの実験では春機発動期前の雌雄牛 (Ezzat ら, 2009) にKp10を投与すると有意なFSH放出反応が見られたがLHの放出反応に比べると弱かった。本研究でも、反応は弱いFSHもLHと同様に放出されることが示唆された。FSHの分泌はLHと異なり、卵巣から分泌されるインヒビンやアクチビンによっても修飾される (Ghosh ら, 1996)。本研究では卵巣が機能している成熟牛を供試しているため、インヒビンやアクチビンなどの影響を受け、春機発動期前の雌雄牛のような明瞭なFSH放出反応が見られなかった可能性が考えられた。

本研究では経産牛および未経産牛でもKp10の静脈内投与はLHを放出させること、およびLHのように明瞭ではないがFSHも上昇する傾向の見られることを初めて明らかにした。また、本研究の結果はKp10がP₄濃度に関わらずLHを放出させることも示し、雌牛のKp10を介した新しい生殖生理機構の一端を明らかにした。

謝 辞

本研究で用いたKp10の合成法についてご指導いただいた、岩手大学農学部山下哲郎博士および牛FSHのRIAキットをご提供いただいた米国Harbor-UCLA Medical CenterのA. F. Parlow博士に深謝します。筆頭著者は、第61回東北畜産学会大会で本研究内容を発表し優秀発表賞を受賞した。

引用文献

- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148 : 5258-5267. 2007.
- Caraty A, Franceschini I. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reprod. Dom. Anim.*, 43 : 172-178. 2008.
- Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147 : 5817-5825. 2006.
- Ezzat AA, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Yamashita T, Hirata T, Sawai K, Hashizume T. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing

- hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J. Reprod. Dev.*, 55 : 650-654. 2009.
- Ghosh BR, Wu JC, Strahi BD, Childs GV, Miller WL. Inhibin and estradiol alter gonadotropes differentially in ovine pituitary cultures: changing gonadotrope numbers and calcium responses to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 137 : 5144-5154. 1996.
- Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 254 : 91-96. 2006.
- Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From *KISS1* to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30: 4-9, 2009.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.*, 25 : 11349-11356. 2005.
- Hashizume T, Takahashi Y, Numata M, Sasaki K, Ueno K, Ohtsuki K, Kawai M, Ishii A. Plasma profiles of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factor-I during gestation, lactation and neonatal period in goats. *J. Reprod. Dev.*, 45 : 273-281. 1999.
- Hashizume T, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Ezzat AA, Sawai K, Yamashita T. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 118 : 37-41. 2010.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of Kiss-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80 : 264-272. 2004.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J. Endocrinol.*, 196 : 331-334. 2008.
- Kanematsu S, Sato N, Hashizume T. Effects of cholecystokinin on luteinizing hormone release from perfused hypothalamus-pituitary in the castrated bulls. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 36 : 54-59. 1990.
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandepuit 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.
- Lents CA, Heidorn NL, Barb CR, Ford JJ. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction*, 135 : 879-887. 2008.
- Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and the control of estrous cycle in rats. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 8 : 21-29. 2007.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Effects of Kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146 : 1689-1697. 2005.
- Prakash BS, Meyer HHD, Schallenberger E, van de Wiel DF. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid. Biochem.*, 28 : 623-627. 1987.
- Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Goto Y, J Jin, Sawai K, Hashizume T. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. *Anim. Sci. J.* 2011. in press (doi:10.1111/j.1740-0929.2011.00978.x).
- 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.
- Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*, 131 : 623-630. 2006a.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. *Kiss1* neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neuroscience*, 26 : 6687-6694. 2006b.
- Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. Kiss-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148 : 1150-1157. 2007.
- Smith JT. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*, 30 : 94-102. 2009.
- Whitlock BK, Daniel JA, Wilborn RR, Rodning SP, Maxwell HS, Steele BP, Sartin JL. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing

hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology*, 88 : 212-215. 2008.

Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Fernandez-Mendez C, García-San Frutos M, Botella-Cubells LM, Fernandez-Vazquez G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats. *Biol. Reprod.*, 70 : 348-345. 2004.

Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Guerra-Perez N, Fernandez-Mendez C, Fernandez-Vazquez G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol. Reprod.*, 68 : 1764-1770. 2003.

Stimulatory effects of kisspeptin-10 on the release of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in cows and heifers

Y. GOTO, H. SAITO, J. JIN, T.-I. HIRATA, K. SAWAI, T. HASHIZUME*

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

*Corresponding : T. HASHIZUME (Tel&Fax : +81-19-621-6161, E-mail : hashi@iwate-u.ac.jp)

The present study aimed to clarify the effect of kisspeptin-10 (Kp10) (a shorter variant of kisspeptin retaining full biological activity) on the release of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in adult female cattle. The experiments were performed using five cows (49.7 months old) and five heifers (11.8 months old) treated with a controlled internal progesterone releasing device (CIDR) for 7 days. The animals received a single intravenous injection of Kp10 (5 µg/ kg BW) on the day of the CIDR's removal (day 0) and 2 days later (day 2). Plasma concentrations of progesterone (P₄) were higher on day 0 than day 2 in cows (2.09 ng/ml vs 0.30 ng/ml) and heifers (2.29 ng/ml vs 0.35 ng/ml) ($P<0.05$). Kp10 significantly stimulated the release of LH on day 0 and day 2 in cows and heifers ($P<0.05$). Plasma LH levels reached a peak 20 - 30 min after the injection, and then gradually returned to basal values. The secretory pattern of LH in response to Kp10 in heifers was similar to that in cows. The injection of Kp10 tended to stimulate the release of FSH in cows and heifers; however, it did not alter plasma concentrations of FSH significantly throughout the experiment. These results show that Kp10 can stimulate the release of LH in adult female cattle regardless of plasma P₄ concentrations.

Key words: Cow, FSH, Heifers, Kisspeptin-10, LH