

魚類の食欲を制御する分子機構を探る ～フグゲノム情報を利用した leptin および agouti の同定～

黒川忠英*

Appetite control systems in fish - Identification of fish leptin and agouti-family genes -

Tadahide Kurokawa *

Abstract To understand the regulation systems of appetite in fish, we identified cDNA coding for leptin and agouti family proteins in pufferfish (*Takifugu rubripes*). The Takifugu leptin was found using genomic synteny around the human leptin gene as a first non-mammalian leptin gene. The Takifugu leptin mRNA was expressed in the liver that contained abundant lipids. In addition, the homologues to *Takifugu* leptin for some fish and amphibians were found in the databanks. The phylogenetic analysis shows rapid rates of molecular divergence among leptins from different vertebrate classes. *Takifugu* has four types of agouti-family genes (*AGRP1*, *AGRP2*, *ASIP1* and *ASIP2*). The *Takifugu ASIP1* expression level was about five times higher in the white ventral skin than in the black dorsal skin. This indicates that the *Takifugu ASIP1* functions to retain the dorsal-ventral pigmentation pattern like to mammalian ASIP. On the other hand, *ASIP2*, *AGRP1* and *AGRP2* mRNA expression were detected in various organs in *Takifugu*. Therefore, the physiological functions of melanocortins and agouti-family proteins seem to be more complex in fish than in mammals.

Key words : leptin, agouti, AGRP, Takifugu

ほ乳類においては、ヒトの肥満という社会的関心の高さから、食欲制御の分子機構に関しての研究が進んでいる。この食欲制御の分子機構に関してエポックメイキングとなったのが、レプチンというホルモンの発見である。この発見は、それまでエネルギー貯蔵のみと考えられていた脂肪細胞が、ホルモンを産生・分泌する内分泌器官でもあり、また、脂肪組織量をコントロールする液性因子があるというという新たな概念を提起した。それ以降、脂肪細胞からはアディポネクチンなどエネルギー代謝に関与する新たな生理活性物質が発見されている (Scherer *et al.* 1995)。レプチンは、Zhang ら (1994) によって遺伝性肥満 (ob/ob) マウスの病因遺伝子として同定された。この肥満遺伝子産物は、強力な摂食抑制と肥満制御作用を有し、ギリシャ語の “leptos” (やせ) にちな

んで “レプチン” (leptin) と命名された。

レプチンは、白色脂肪細胞から分泌され、脳の視床下部にある食欲中枢 (Arcuate nucleus) に作用することにより、摂食抑制と脂肪分解、褐色脂肪細胞における熱産生をもたらすホルモンである (Fig.1)。食欲中枢では、レプチンはレプチン受容体を介して、食欲の促進的に働く neuropeptide Y (NPY) ニューロンと抑制的に働く α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) ニューロンに作用している (Horvath *et al.* 2001; Wynne *et al.* 2005)。NPY ニューロンには、 α -MSH の内因性アンタゴニストである Agouti related protein (AGRP) が存在し、食欲促進時には NPY ニューロンの活性化と同時に AGRP による α -MSH ニューロンの抑制が行われると考えられている (Broberger *et al.* 1998)。皮膚で発現している類似の agouti-signaling

2008年4月23日 受理 (Received on April 23, 2008)

*水産総合研究センター養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 422-1, Nakatsuhama, Minamiise, Watarai, Mie, 516-0193, JAPAN)

現所属: 水産総合研究センター東北水産研究所 〒985-0001 宮城県塩釜市新浜町 3-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 3-27-5, Shinhama, Shioyama, Miyagi, 985-0001, JAPAN)

protein (ASIP) は、やはり遺伝性肥満 (yellow agouti) マウスの病因遺伝子として同定されている (Miller *et al.* 1993)。一方、 α -MSH ニューロンには cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) が共存し、食欲抑制に機能していると考えられている (Elias *et al.* 1998)。さらに、レプチンとは拮抗的な働きを持つグレリンというホルモンが発見されている。最初グレリンは、胃から分泌される成長ホルモン分泌刺激ホルモンとして、Kojima ら (1999) により同定された。その後、グレリンには食欲促進作用もあることが明らかになった。やはりグレリンも食欲中枢において、グレリン受容体 (GHS-R) を介して NPY ニューロンに作用していると考えられている (Tamura *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002)。つまり、脂肪細胞から分泌されるレプチンが、体のエネルギーの蓄積状態を神経系に伝える因子として、また胃から分泌されるグレリンが体の空腹状態を神経系に伝える因子として機能しているのである。

マダイやヒラメなど一部の魚種では選抜育種により高成長系統などが作出されつつあり、このような高成長群では無選抜群よりも摂餌量が多い事が知られている。しかし、このような形質がどのような遺伝子によってもたらされているかは明らかにされていない。グレリンは、本バイオデザインプロジェクトが開始される時点で、すでに数種の魚類から同定されていた (Kaiya *et al.* 2003; Kaiya *et al.* 2003; Kaiya *et al.* 2003)。しかし、レプチンはほ乳類以外の脊椎動物からは同定されていない。変温動物である魚類は、食欲やエネルギーの蓄積機構がほ乳類とは異なると予想されることから、魚類におけるレプチンや Agouti などの食欲制御因子の生理機能を明らかにすることは、魚類養殖技術の高度化に重要であると考えられた。

レプチン

魚類においても、レプチンの存在を示唆する報告がいくつかなされていた (Johnson *et al.* 2000; Muruzábal *et al.* 2002; Vegusdal *et al.* 2003)。これらはいずれも、哺乳類レプチンに対する抗体を用いて、免疫化学的に組織や血清中に免疫陽性反応を示す因子を検出したものであった。しかし、分子に関する情報は全く得られていなかった。

近年、生物の遺伝子情報の蓄積が進み、魚類においてもトラフグ (*Takifugu rubripes*) を初めとして数種の全ゲノムの塩基配列の決定がなされてきた。このような遺伝子情報を利用し、多くの研究グループが、魚類のレプチン遺伝子をほ乳類のレプチン遺伝子との相同性から特定しようと試みたが、いずれもうまくいっていなかった。このことから、魚類にレプチンが存在するとしても、ほ乳類のレプチンとは相同性がきわめて低いと考えられた。

そこで我々は、ヒトのレプチン遺伝子周辺のゲノム上の遺伝子の並び方に相同性を持ったゲノム領域が、トラフグゲノム上に存在するかどうかを解析した。ヒトのレプチン遺伝子は7番染色体のq31にマップされ、その周りには RBM28, LRRC4, Pax4 などの遺伝子が分布している。これらレプチン周辺の遺伝子に相当する遺伝子をフグゲノム上で探索したところ、類似した遺伝子の並び方をしている領域が2カ所 (scaffold 12 and 866, JGI Ver.3) 見いだされた (Fig.2a)。このように遺伝子が重複して存在するのは、硬骨魚類の進化の過程でゲノムが倍加したことに由来すると推察された (Amores *et al.* 1998; Taylor *et al.* 2003)。したがって、レプチン遺伝子がトラフグにもあるとすれば、このゲ

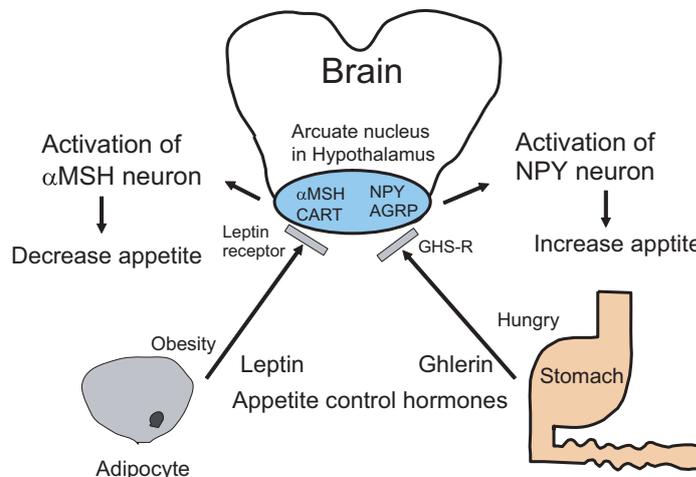


Fig. 1. The model of central regulation of daily energy homeostasis and their relationship to peripheral and putative hypothalamic ghrelin and leptin (review in Horvath *et al.*, 2001).

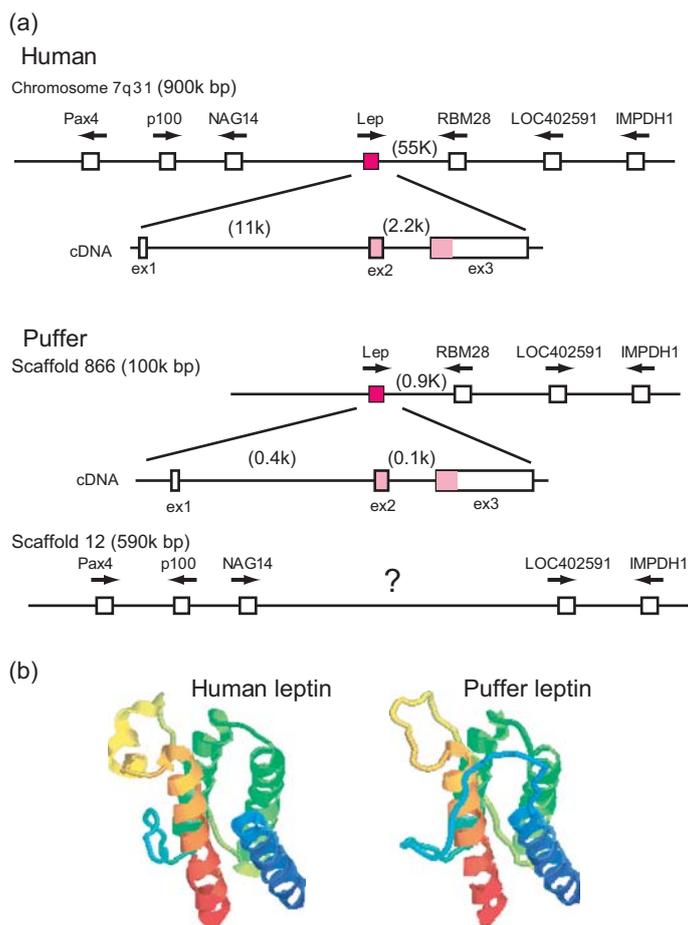


Fig. 2. Comparison of leptin gene characterization between human and *Takifugu*. (a) The gene arrangement and the cDNA structure of leptin gene. Arrows indicate the direction of transcription of the genes. Shaded areas indicate open reading frame. GenBank accession nos. : Pax4, NM_006193; SND1, NM_014390; NAG8, NP_055226; LRRC4, NM_022143; RBM28, NP_060547; LOC401339, XP_379517; IMPDH1, NP_000874 . (b) Ribbon diagram showing the tertiary structure of human and puffer leptin. Secondary and tertiary protein structures were modeled using the ProModII program at the SWISS-MODEL automated protein modeling server, based upon human leptin (1AX8.pdb) Protein Data Bank structure file. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2005).

ノム領域に存在する可能性が高いと考えられた。

そこで、このゲノム領域に存在する未同定の遺伝子を、Genscanプログラム (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) により予測した。その結果、Scaffold 866 の RBM28 遺伝子の近傍に、レプチンと類似した遺伝子構造を持つ遺伝子が予測された。これが、実際に発現している遺伝子か否かを確認するため、このゲノム情報を元にプライマーを設計し、トラフグ稚魚の体全体の cDNA をテンプレートとした RT-PCR を行った。予想通りの PCR 産物が得られたことから、3' および 5' RACE PCR 法を用いて、この遺伝子の cDNA 全長の塩基配列を決定した。この遺伝子は、152 アミノ酸をコードする翻訳領域を含む 791bp の塩基対から成っていた。また、トラフグゲノム情報から、この遺伝子はヒトレプチン遺伝子と同様に 3つのエクソンから構成されていることが明らかになった (Fig.2a)。

このトラフグの遺伝子がコードするアミノ酸配列は、ヒトレプチンと比較して 13.2% の相同性しか認められなかった。しかし、ほ乳類レプチンの中で保存されている SS 結合を形成するための 2カ所のシステインの位置は保存されていた。さらに、タンパク質の立体構造を SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) によって予測したところ、4本のアルファヘリックス構造を持つヒトレプチンに非常によく似た構造を持つことが明らかになった (Fig. 2b)。これらのことから、我々はこの遺伝子がトラフグのレプチン遺伝子であると結論づけた (Kurokawa *et al.* 2005)。

トラフグレプチン遺伝子の組織発現パターンを解析した結果、肝臓で強い発現が認められた (Fig. 3)。ほ乳類レプチンは、先に示したように主に脂肪細胞で発現している遺伝子である。しかし、フグ科魚類は明瞭

な脂肪組織を持たず、脂肪の大部分を肝臓に蓄積している (Akiyoshi and Inoue 2004)。フグの肝細胞は、細胞内に大量の油滴を蓄えた脂肪細胞と類似した構造を持っている。今回得られた遺伝子は、フグの肝細胞の細胞質で特異的に発現していたことから、やはり脂肪細胞と関連していると推察された。

トラフグレプチンのアミノ酸配列を基に、遺伝子データベースを検索した結果、ミドリフグ、メダカ、大西洋サケなどのレプチン遺伝子を同定するとともに、サンショウウオやアフリカツメガエルなどの両生類のレプチン遺伝子まで同定することができた (Fig.4)。これらのことから、レプチン遺伝子は広く脊椎動物に保存されている遺伝子であることが明らかになった。レプチンのアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成すると、近縁なトラフグとミドリフグ間でも48%の相同性しか認められず、魚類間 (18-48%の相同性) ではほ乳類間 (80%以上の相同性) に比べて非常に相同性が低いことが明らかになった。一方、原始的な硬骨魚類とされるサケ科魚類のレプチンの方がより両生類のレプチンに近い傾向が見られた。これらのことは、レプチンが魚類の進化の過程で非常に大きく変異してきた分子であることを示していると考えられる。(分子系統樹の中に鳥類のレプチンを記載しているが、マウスレプチンと塩基レベルで97%以上の相同性を示すことや、ニワトリゲノム中に相当する配列が認められないなど、報告の再現性が疑問視されているので (Doyon *et al.* 2001)、括弧書きで記載した。)

我々の報告後、サンショウウオ (Boswell *et al.* 2006) やコイ (Huising *et al.* 2006) のレプチンに関する報告がなされている。コイにおいては、非常に相同性の高い2種類のレプチン遺伝子が同定されている。コイでは、初めて魚類の生理状態とレプチン遺伝子の発現との関連について報告がなされたが、leptin 遺伝子の肝臓における発現は短期・長期的な絶食状態に対しても変化は認められていない。

我々も、魚類におけるレプチンの生理機能を探るため、給餌試験などが容易なニジマスからレプチン遺伝子をクローニングした。ニジマスにおいては、脂肪組織だけでなく肝臓でもレプチン遺伝子の発現が認められた (未発表データ)。サケ科魚類は、肝臓には脂肪ではなくグリコーゲンを蓄積するタイプの魚種であるが、フグと同様に肝臓での遺伝子発現が認められた。コイも同様の報告がなされており、魚類では一般的に肝臓でレプチン遺伝子が発現していると考えられる。ニジマスを2週間絶食させ、レプチン遺伝子の発現量の変化を解析したが、絶食に伴う明確な変化は認められなかった。

今のところ、魚類におけるレプチンの生理機能は十分に明らかにされていない。現在我々は、ニジマスの組替えレプチンタンパク質の作製と特異抗体の作製を行い、組替えレプチンのニジマスへの投与実験や、摂餌と血中レプチンレベルの関係を解析する実験を継続している。

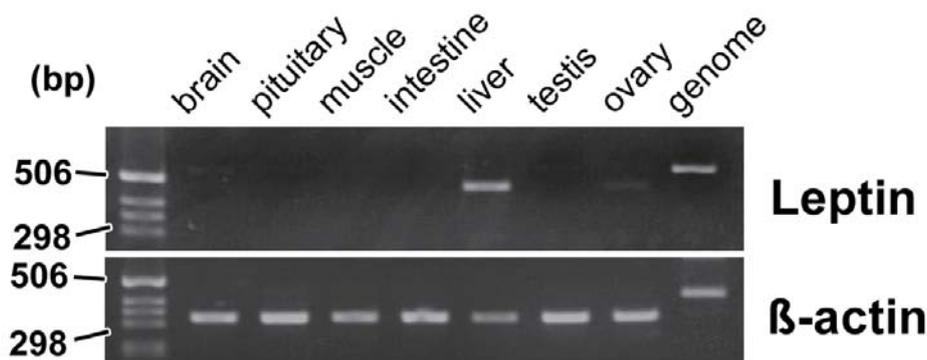


Fig. 3. Expression of *Takifugu* leptin mRNA in adult tissues and genomic DNA. The β -actin fragment of *Takifugu* was also amplified to confirm the steady state level of expression of the housekeeping gene. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2005).

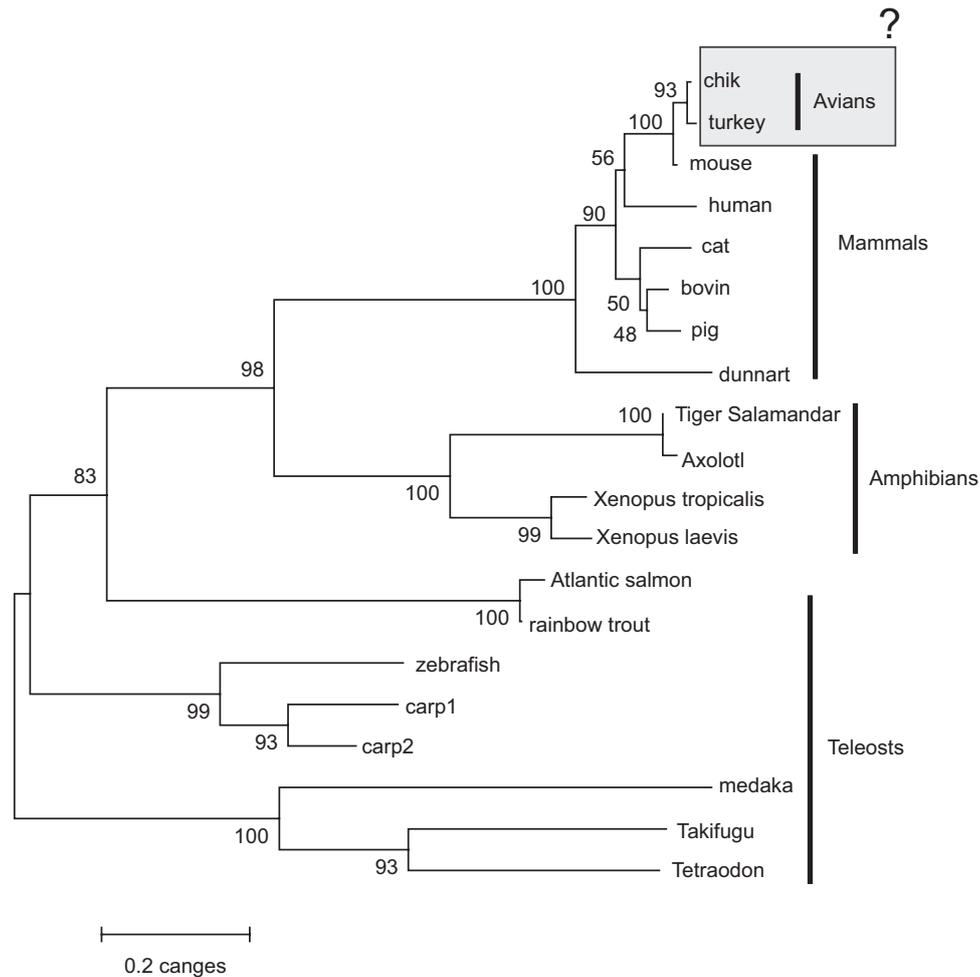


Fig. 4. Phylogenetic relationships among vertebrate leptins were inferred using the neighbor-joining method in Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) and MEGA3 (<http://www.megasoftware.net/>). Scale bar indicates the substitution rate per residue. Numbers at nodes indicate the bootstrap value, as percentages, obtained for 1000 replicates. Avian leptins were shaded due to the uncertainty of the existence of a valid leptin homologue.

Agouti

ほ乳類においては、皮膚で発現している agouti-signaling protein (ASIP) と神経系で発現している agouti-related protein (AGRP) という 2 種類の agouti 関連タンパク質があり、melanocortin 受容体 (MC1R - MC5R) を介して melanocortin peptides (melanocyte stimulating hormones/MSHs や ACTH) の内因性アンタゴニストとして機能している (Lu *et al.* 1994; Ollmann *et al.* 1997)。ASIP は、皮膚において MC1R に対する α -MSH のアンタゴニストとして作用し、マウスでは背腹軸方向の体色パターン形成に重要な役割を持つことが知ら

れている (Vrieling *et al.* 1994)。一方、AGRP は脳内の MC3R や MC4R に対する α -MSH のアンタゴニストとして作用し、食欲制御に重要な役割を持っている (Graham *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000; Chen *et al.* 2000)。

非ほ乳類の agouti 関連タンパク質としては、ニワトリの AGRP が最初の報告であった (Tachibana *et al.* 2001)。鳥類においても、AGRP はエネルギー代謝に重要な役割を持っていることが示唆されている (Tachibana *et al.* 2001; Boswell and Takeuchi 2005)。魚類の agouti 関連タンパク質については、近年いくつかの報告がなされた。キンギョ (*Carassius auratus*) においては、ASIP が皮膚において α -MSH のアンタ

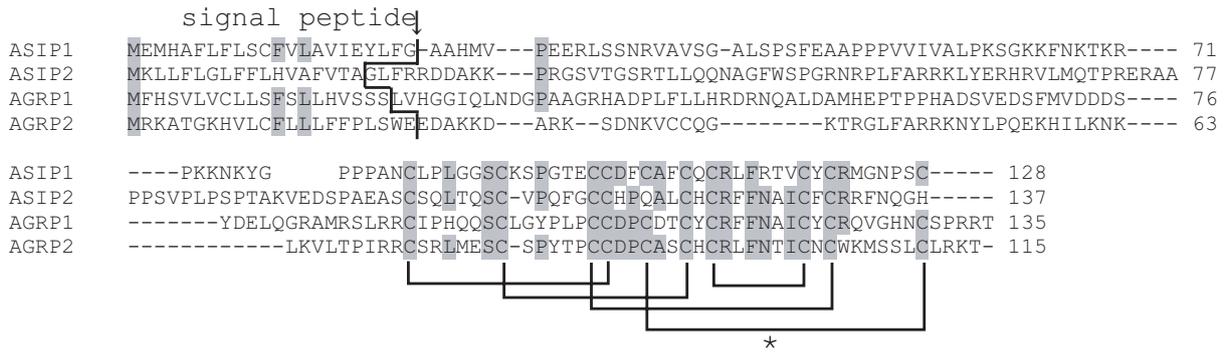


Fig. 5. Alignment of the deduced amino acid sequences of *Takifugu* agouti-family genes with identified cDNA in this study. Deletions are indicated by dashes and shaded areas indicate residues shared among $\geq 70\%$ of sequences. Conserved cysteine residues involved in the formation of disulfide bonds are shown by bridges. Asterisks show that the 5th and 10th cysteine are lacking in pASIP2. The cleavage site was estimated using the SignalP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The amino acid sequences of ASIP1, AGRP1, AGRP2, and ASIP2 (C-terminal) were consistent with Klovin's data (Klovin *et al.*, 2004; 2005). (Modified from Kurokawa *et al.*, 2006).

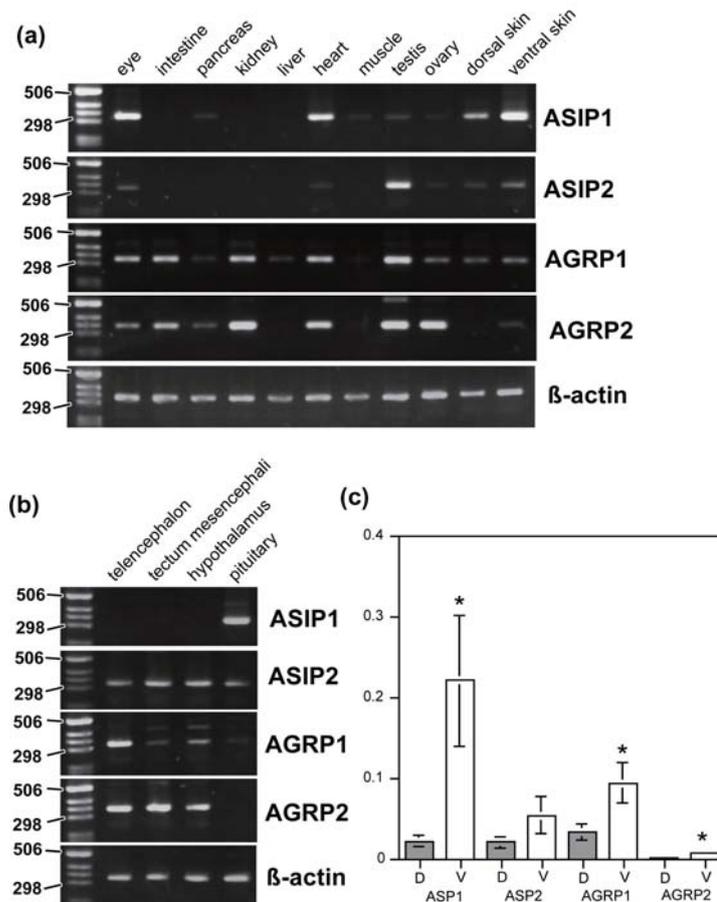


Fig. 6. Expression of *Takifugu* agouti-family genes in the peripheral organs (a) and in the brain and pituitary (b) analyzed using RT-PCR and in the skin (c) analyzed using real-time PCR. Asterisks show a significantly higher ($P < 0.05$) expression level of agouti-family genes in the ventral skin (V) than in the dorsal skin (D) as indicated by real-time PCR analysis. The β -actin fragment of *Takifugu* was also amplified to confirm the steady-state level of expression of the housekeeping gene. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2006).

ゴニストとしての作用を持つことが報告されている (Cerdá-Reverter *et al.* 2005)。また、脳内の AGRP がエネルギー代謝に関与していることがキンギョやゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) で報告されている (Cerdá-Reverter and Peter 2003; Song *et al.* 2003)。また、トラフグやミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) においては、哺乳類と異なり 3 種類の agouti 関連タンパク質が報告されていた (Klovins *et al.* 2004; Klovins and Schiöth 2005)。

そこで我々は、まずトラフグが何種類の agouti 関連遺伝子を持つのかを明らかにするため、トラフグゲノムデータベースを利用して agouti 関連タンパク質を網羅的に検索した。Agouti タンパク質は、C 末端に agouti-related motifs (5 対の SS 結合を形成するためのシステイン残基が含まれる) と呼ばれる保存性の高い領域がある。このモチーフを基に検索したところ、トラフグには 4 種類の agouti 関連遺伝子を持つことが明らかになった (Kurokawa *et al.* 2006)。C 末端のアミノ酸配列の特徴などから、それぞれトラフグ ASIP1, ASIP2, AGRP1, AGRP2 とした。これら 4 つの agouti 関連タンパク質の C 末端のシステイン残基はよく保存されていたが、ASIP2 だけは 4 番目のシステイン残基対を欠いていた (Fig. 5)。遺伝子構造をゲノムデータベースから推定したところ、ASIP1 と AGRP1 は 4 つのエクソンから、ASIP2 と AGRP2 は 3 つのエクソンから構成されていた。

トラフグにおける agouti 関連遺伝子の組織発現パターンを、RT-PCR および realtime-PCR 法により解析した (Fig. 6)。ASIP1 は、皮膚で最も強く発現しており、背側 (黒色部) に比べて腹側 (白色部) では 5 倍以上強く発現していた。このことから、魚類においても ASIP1 が背腹軸方向の体色パターン形成に関与していると推察された。さらに、ASIP1 は下垂体、眼、心臓で強い発現が認められた。一方、AGRP1 および AGRP2 は、ともに脳だけでなく多くの組織で発現が認められた。このように、melanocortin peptides の内因性アンタゴニストである agouti 関連タンパク質が 4 種類存在し、その組織発現パターンから機能分化をしていると考えられることから、魚類における melanocortin peptides の生理作用は哺乳類のそれよりも複雑であることが予想された。

おわりに

本研究によって、魚類において未同定であったレプチンや agouti 関連タンパク質を同定することができ、食欲制御に関与する因子が魚類においてもようやく解

析可能になったと考えられる。

最近、ゼブラフィッシュにおいて、AGRP を過剰発現させると摂餌量の増加が見られるという報告がなされた (Song and Cone 2007)。これは、魚類においても α -MSH と AGRP のシステムが食欲制御に関与していることを示している。魚類においては、4 種類の agouti 関連タンパク質が存在するなどほ乳類との相違点も多いことから、今後レプチンなども含めて総合的に魚類における食欲とエネルギー蓄積の制御機構を解明し、より効率的な飼養技術の開発や遺伝子機能に基づいた育種技術の開発につなげていきたいと考えている。

文 献

- Akiyoshi H., and Inoue A., 2004: Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoolog. Sci.*, **21**, 841-50.
- Amores A., Force A., Yan, Y.-L., Joly L., Amemiya C., Fritz, A., Ho R. K., Langeland J., Prince V., Wan Y.-L., Westerfield M., Ekker M., and Postlethwait, J. H., 1998: Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, **282**, 1711-1714.
- Boswell T., Dunn I. C., Wilson P. W., Joseph N., Burt D. W., and Sharp P. J., 2006: Identification of a non-mammalian leptin-like gene: characterization and expression in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Gene. Com. Endocrinol.*, **146**, 157-166.
- Boswell T., and Takeuchi, S., 2005: Recent developments in our understanding of the avian melanocortin system: its involvement in the regulation of pigmentation and energy homeostasis. *Peptides*, **26**, 1733-1743.
- Broberger C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. and Hokfelt, T., 1998: The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15043-15048.
- Cerdá-Reverter, J. M., Haitina, T., Schiöth, H. B. and Peter, R. E., 2005: Gene structure of the goldfish agouti-signaling protein: a putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish. *Endocrinology*, **146**, 1597-1610.
- Cerdá-Reverter, J. M. and Peter, R. E., 2003: Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene.

- Endocrinology*, **144**, 4552–4561.
- Chen, A. S., Marsh, D. J., Trumbauer, M. E., Frazier, E. G., Guan, X. M., Yu, H., Rosenblum, C. I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J. M., Strack, A. M., Camacho, R. E., Mellin, T. N., Nunes, C. N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D. E., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H., 2000: Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.*, **26**, 97–102.
- Chen, A. S., Metzger, J. M., Trumbauer, M. E., Guan, X. M., Yu, H., Frazier, E. G., Marsh, D. J., Forrest, M. J., Gopal-Truter, S., Fisher, J., Camacho, R. E., Strack, A. M., Mellin, T. N., MacIntyre, D. E., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H., 2000: Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res.*, **9**, 145–154.
- Doyon, C., Drouin, G., Trudeau, V. L. and Moon, T. W., 2001: Molecular evolution of leptin. *Gene. Com. Endocrinol.*, **124**, 188–98.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. and Elmquist, J. K., 1998: Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, **21**, 1375–1385.
- Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, U., Sarosi, I. and Stark, K. L., 1997: Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.*, **17**, 273–274.
- Horvath, T. L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. and Tschöp, M., 2001: Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance—A hypothalamic perspective. *Endocrinology*, **142**, 4163–4169.
- Huising, M. O., Geven, E. J., Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Stolte, E. H., Spanings, F. A., Verburg-van Kemenade, B. M. and Flik, G., 2006: Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, **147**, 5786–5797.
- Johnson, R. M., Johnson, T. M. and Londraville, R. L., 2000: Evidence for leptin expression in fishes. *J. Exp. Zool.*, **286**, 718–24.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H. and Kangawa, K., 2003: Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, **144**, 5215–26.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. and Kangawa, K., 2003: Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J. Endocrinol.*, **176**, 415–23.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. and Kangawa, K., 2003: Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **135**, 421–9.
- Klovins, J., Haitina, T., Fridmanis, D., Kilianova, Z., Kapa, I., Fredriksson, R., Gallo-Payet, N. and Schiöth, H. B., 2004: The melanocortin system in Fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 563–579.
- Klovins, J. and Schiöth, H. B., 2005: Agouti-related proteins (AGRPs) and agouti-signaling peptide (ASIP) in fish and chicken. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1040**, 363–367.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K., 1999: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- Kurokawa, T., Murashita, K. and Uji, S., 2006: Characterization and tissue distribution of multiple agouti-family genes in pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **27**, 3165–3175.
- Kurokawa, T., Uji, S. and Suzuki, T., 2005: Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **26**, 745–750.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O. and et al., 1994: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, **371**, 799–802.
- Miller, M. W., Duhl, D. M., Vrieling, H., Cordes, S. P., Ollmann, M. M., Winkes, B. M. and Barsh, G. S., 1993: Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Gene. Dev.*, **7**, 454–467.
- Muruzábal, F. J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi,

- J., Archanco, M. and Burrell, M. A., 2002: Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gene. Com. Endocrinol.*, **128**, 149-52.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I. and Barsh, G. S., 1997: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, **278**, 135-138.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H. F., 1995: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26746-26749.
- Song, Y. and Cone, R. D., 2007: Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J.*, **21**, 2042-2049.
- Song, Y., Golling, G., Thacker, T. L. and Cone, R. D., 2003: Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio*. *Endocrinology*, **22**, 257-265.
- Tachibana, T., Sugahara, K., Ohgushi, A., Ando, R., Kawakami, S., Yoshimatsu, T. and Furuse, M., 2001: Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci. Lett.*, **305**, 131-134.
- Tamura, H., Kamegai, J., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. and Oikawa, S., 2002: Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology*, **143**, 3268-3275.
- Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. and Van de Peer, Y., 2003: Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.*, **13**, 382-90.
- Vegusdal, A., Sundvold, H., Gjoen, T. and Ruyter, B., 2003: An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of Atlantic salmon preadipocytes. *Lipids*, **38**, 289-96.
- Vrieling, H., Duhl, D. M., Millar, S. E., Miller, K. A. and Barsh, G. S., 1994: Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5667-5671.
- Wang, L., Saint-Pierre, D. H. and Tache, Y., 2002: Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.*, **325**, 47-51.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. and Bloom, S., 2005: Appetite control. *J. Endocrinol.*, **184**, 291-318.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M., 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425-32.