

생체리듬과 신경내분비 시스템

손기훈 · 정수영 · 김경진

서울대학교 자연과학대학 생명과학부 및 21세기 프론티어 연구개발사업 뇌기능활용 및 뇌질환치료기술 개발연구사업단

Biological Rhythms and Neuroendocrine Systems

Gi Hoon Son, Sooyoung Chung, Kyungjin Kim

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Seoul National University, and Brain Research Center for the 21st Century Frontier Program in Neuroscience, MEST, Seoul, Korea

서 론: 생체리듬과 생체시계

발생, 생리, 대사, 행동 등 다양한 생명 현상은 항상성(homeostasis)을 유지하려는 경향과 더불어 다양한 형태의 주기적인 특성을 나타내는데, 대다수의 생명체에서 공통적으로 관찰되는 이러한 본질적인 주기성을 통칭하여 생체리듬(biological rhythm)이라 정의한다. 생체리듬은 그 주기에 따라 약 24시간 주기의 일주기 리듬에서부터 그 보다 짧은 아일주기 리듬(ultradian rhythm, 호흡, 맥박, 체온 및 호르몬의 맥동적 분비 등)과 하루보다 긴 월주기성, 년주기성, 궁극적으로는 생명체의 일생(life cycle)을 포함하는 infradian rhythm 등으로 구분한다. 생체시계(biological clock)는 포괄적인 의미로 앞서 언급된 모든 생물학적 리듬을 유도하는 내인성 기작으로 정의할 수 있지만, 최근 일주기 유전자들이 동정되면서 일주기 생체시계를 협의의 생체시계로 정의하기도 한다. 일주기 생체리듬이 유전자에 의해 분자·세포 수준에서 생성될 수 있다는 사실은 생물학 전반에 큰 영향을 미쳤으며, 다양한 주기의 내재적인 주기성들이 이와 마찬가지로 분자 수준의 동인, 즉 분자 진자(molecular oscillator)에 의해 생성될 것이라는 생각이 확산되고 있다. 주지할만한 사실은 다양한 수준의 생체리듬이 관찰되는 대표적인 생물학적 시스템인 동시에 생리적 리듬의 주요 조절자로서 인식되어온 것이 바로 신경내분비 시스템이라는 점이다. 예를 들면, 송과선의 멜라토닌이나 부신 피질의 글루코코르티코이드(glucocorticoid, GC)의 일주기성은 가장 널리 알려진 호르몬의 일주기적 분비이다. 또한 다양한 펩타이드

드성 및 스테로이드성 호르몬들의 분비 양상이 약 1-2시간 주기의 ultradian rhythm을 나타내며, 종에 따라 수일에서 수개월에 걸쳐서 나타나는 생식주기 및 이를 관장하는 신경내분비축의 변화는 infradian rhythm의 대표적인 예로 언급된다. 따라서 본 종설은 신경내분비 시스템에서 분자 생체시계의 역할과 그 중요성을 다루고자 하며, 특히, 부신 GC의 일주기성과 뇌 시상하부에서 합성·분비되는 생식소자극호르몬 방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)의 맥동성을 대상으로 생체리듬의 분자적 양상에 관한 최근의 연구 성과를 소개하고자 한다.

일주기 리듬과 생체시계 분자 네트워크

1. 일주기 생체리듬

일주기 리듬(circadian rhythm)은 약 24시간 주기로 나타나는 일체의 생물학적 리듬을 포괄하는 개념으로 수면-각성 주기와 그에 따른 활동성, 체온의 변화 및 호르몬 분비 양상 등이 일주기성을 나타내는 대표적인 생명 현상이다(Fig. 1A). 일주기 생체리듬은 하루를 주기로 자전하는 지구상에 존재하는 생명체들이 진화적으로 적응한 결과로 믿어진다. 따라서 남조류와 같은 단세포 생물에서부터 포유류와 같은 고등동물에 이르기까지 대부분의 종에서 보편적으로 관찰되는 현상이다. 흥미로운 점은 이러한 일주기 생체리듬은 밤낮이라는 규칙적인 환경의 변화에 생명체가 단순히 생리적으로 적응함으로써 나타나는 현상이 아니라 일단의 유전자에 기반한 내재적인 분자 진자에 의해 나타난다는 사실인데 이러한 분자 진자를 일주기 생체시계(circadian clock)라고 한다[1]. 최근 일주기 생체시계의 분자적 정체가 규명되면서 생체시계(biological clock)가 좁은 의미로는 이러한 일주기 생체시계를 지칭하는 용어로 사용되기도 한다. 내재적인 생체시계의 존재는 규칙적으로 반복되는 밤과 낮의 변

Corresponding author: Kyungjin Kim, Ph.D.
Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Seoul National University and Brain Research Center for the 21st Century Frontier Program in Neuroscience, MEST, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
Tel: +82-2-880-6694/+82-2-872-9100; Fax: +82-2-872-9108
E-mail: kyungjin@snu.ac.kr

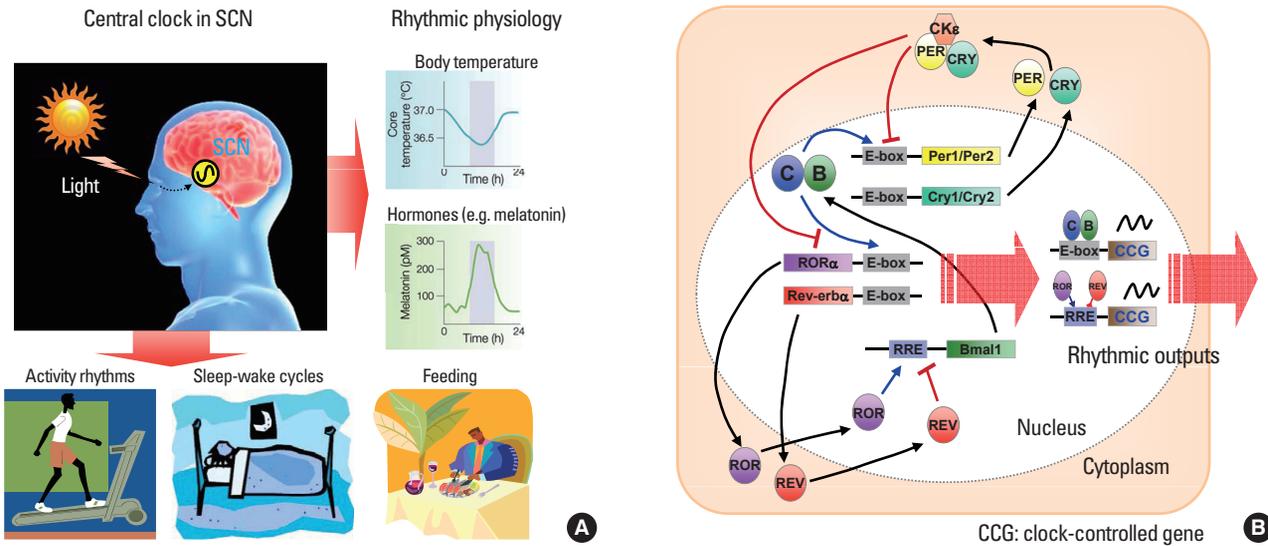


Fig. 1. Circadian timing system. (A) Various daily rhythms in human. (B) A schematic diagram showing the mammalian molecular clockwork composed of a subset of clock genes forming transcription/translation-based feedback loops.

화를 미리 예측하고 생리적으로 이에 대비할 수 있게 함으로써 진화적으로 이점을 가졌을 것이라고 추측된다. 예를 들면, 야행성 포식자에 대해 피식자가 그 활동 시간을 미리 예측할 수 있을 때 생존 확률이 크게 증가될 수 있기 때문이다.

일주기 생체시계 시스템은 유전자 네트워크에 기반하여 자발적으로 약 24시간의 주기를 생성해 내지만, 실제 물리적인 밤과 낮의 변화에 끊임없이 동조하여 그 주기를 정확히 환경의 변화 주기에 일치시키는 기작(entrainment) 역시 함께 작동하고 있어서 환경의 변화와 내재적인 일주기를 끊임없이 일치시킨다. 내재적인 생체시계의 상(phase) 혹은 주기(period)를 재설정하여 밤과 낮의 주기적 변화에 동조시키는 일체의 환경적 자극을 zeitgeber (zeit는 시간, geber는 부여자라는 의미임)라고 정의한다. 빛 자극은 가장 강력하고 대표적인 zeitgeber인데 이외에도 온도 변화, 섭식, 개체 운동성도 zeitgeber로 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 표면적으로 관찰되는 생명체의 일주기 생체리듬은 내재적인 생체시계와 이를 재설정하는 zeitgeber 사이의 끊임없는 상호작용을 통해 구현되는 것이다. 인간을 포함한 포유류의 일주기 생체리듬의 중추는 해부학적으로 뇌시상하부의 시신경교차상핵(suprachiasmatic nucleus, SCN)에 존재하는 것으로 알려져 있다. SCN에 존재하는 중추 생체시계(central clock 혹은 master clock)는 일체의 외부 자극이 없이도 장기간 내재적 일주기 리듬을 유지할 수 있는 속성을 가지며, 각종 신경성 및 체액성 신호를 통해 개체 수준의 일주기 리듬을 관장한다. 따라서 SCN을 외과적으로 파괴할 경우 각종 생리적, 행동학적 일주기 리듬이 사라지게 된다. 아울러 SCN 중추 생체시계는 망막-시상하부 회로(retinohypothalamic tract)를 통해 빛 자극을 인식하여 신속히 재설정됨으로써 개체 수준의 일주기 리듬의 재설정에서도 중

추적인 역할을 담당한다[1].

2. 포유류의 일주기 생체시계 분자 네트워크

일주기 생체리듬의 생성이 유전자의 작용에 의해 내재적으로 이루어진다는 사실은 1970년대 초반 초파리를 이용한 일련의 연구에서 처음 시사되었으나, 한동안 이에 대한 연구는 큰 진전을 이루지 못하고 있었다. 하지만 1990년대 후반 포유류에서 CLOCK 유전자가 동정되면서 일주기 생체시계의 분자적 실체를 규명하려는 연구들이 크게 활기를 띠게 되었는데, 그 이후 일련의 생체시계 유전자들이 속속 밝혀지면서 세포 수준에서 일주기 리듬을 만들어내는 분자 진자에 대한 이해의 폭이 크게 넓어지고 있다[2,3]. 포유동물의 경우 가장 상위 단계의 전사인자는 CLOCK과 BMAL1이며, 이들의 조절을 받는 하위 유전자로는 period 계열의 유전자(PERs: PER1, PER2 및 PER3), cryptochrome 계열의 유전자(CRYs: CRY1과 CRY2) 및 핵 수용체 계열의 RORα과 REV-ERBα 등이 있다. 이들 생체시계 유전자들이 일련의 전사/해독 피드백 고리(transcription/translation feedback loop)를 형성하면서 단일 세포 수준에서 자발적인 분자 진자로 작동하게 된다(Fig. 1B). 우선 CLOCK과 BMAL1 단백질은 이합체를 형성하여 하위 유전자들의 조절 부위인 프로모터 상의 E-box cis-element와 결합함으로써 전사 수준에서 하위 유전자의 발현을 조절한다. 이러한 하위 유전자에는 PERs 및 CRYs와 같은 억제자도 포함되는데 세포 내에 축적된 PERs 및 CRYs 단백질은 세포핵 내로 이동하여 CLOCK:BMAL1 이합체의 전사 활성을 강력히 억제함으로써 자신들의 유전자 발현을 억제하는 음성 피드백(negative feedback)을 형성한다. 이후 세포 내 PERs 및 CRYs 단백질들의 양이 역치 이하로 감소하게 되면 다시 CLOCK:BMAL1에 의한 전사 조절이

재개되어 주기적인 유전자 발현 조절이 가능한 것이다. 이러한 조절 기구를 생체시계 분자 네트워크의 핵심 고리(core loop)라고 한다. 이와 더불어 CLOCK:BMAL1 전사인자의 하위 유전자이며 핵수용체의 일종인 ROR α 과 REV-ERB α 은 BMAL1 유전자의 프로모터에 경쟁적으로 작용함으로써 BMAL1 유전자의 일주기적 발현을 유도한다. ROR α 은 BMAL1 유전자 발현을 증가시키며, 이에 비해 REV-ERB α 는 강력한 전사 억제인자로 작용한다. 이러한 조절 기작을 생체시계 보조 고리(auxillary loop)라고 하며, 이는 중추 고리의 주기 및 진폭을 안정화시키는 역할을 담당한다고 생각되기에 안정화 고리(stabilizing loop)라고도 부른다.

최근, 분자 생체시계의 전사/해독 피드백 고리가 안정적으로 유지되고 필요에 따라 재설정되는 과정에서 다양한 방식의 전사 후 공정 혹은 해독 후 공정이 주요 조절 기작으로 작용한다는 사실이 알려지며, 일주기 생체시계 유전자 발현 조절의 핵심 연구 분야로 각광을 받고 있다. 실제로 인산화/탈인산화, 아세틸화/탈아세틸화 및 ubiquitination/sumoylation 등의 해독 후 조절 기작들이 생체시계 분자 네트워크의 안정적인 작동에 핵심적인 역할을 담당한다는 사실이 속속 밝혀지고 있다. 이런 맥락에서 본 연구진은 최근 일주기 생체시계에 대한 분자생물학 및 세포 동역학적 분석을 통해 CLOCK의 인산화에 의해 촉발되는 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성화 및 co-activator와의 결합을 통한 하위 유전자의 전사 활성이 생체시계 재설정 과정에서 핵심적인 역할을 수행한다는 사실을 규명하였으며 [4-6], 또한 생체시계가 작동하는 과정에서 CLOCK:BMAL1 이합체의 세포 내 사이클링의 분자 기작과 sumoylation/ubiquitination을 통한 단백질 분해 경로와 전사 활성 사이의 상관관계를 입증하여 분자 생체시계의 작동 원리에 대한 이해를 증진한 바 있다 [7,8].

생체시계의 정체가 규명되면서 밝혀진 가장 흥미로운 사실의 하나는 생체시계 유전자들이 중추 생체시계의 역할을 담당하는 SCN 페이스메이커(pacemaker) 세포들뿐만 아니라 거의 모든 종류의 세포에서 기능적으로 발현되고 있다는 사실이다. 즉, 간, 폐, 근육, 심장을 비롯한 대부분의 조직이나 기관에서도 일주기 생체시계 유전자가 발현되며 중추시계의 경우와 유사한 기작을 통해 일주기적으로 조절된다. 특히 오랜 기간 체외 배양된 섬유아세포주에서도 단일 세포 수준의 일주기 리듬이 존재하며 다양한 세포 내 신호전달 경로를 활성화하여 이를 동조시킬 수 있다는 사실의 발견은 생체시계 연구분야의 기념비적인 업적이었다 [9]. 이러한 말초 조직의 생체시계를 중추 생체시계에 대비하여 말초시계(peripheral clock) 혹은 국부시계(local clock)로 구별한다. 외부 환경 변화를 인식하여 개체 수준의 일주기 리듬을 재설정하는 과정은 기본적으로 중추시계에서 일어나며, 여러 신경성 혹은 체액성 신호를 통해 말초시계들이 중추시계의 상에 동조화된다는 사실이 밝혀짐으로써, 개체 수준에서의 일주기 생체시계가 중추시계와 말초시계 사이의 위계적인 구조에 의해 구성된다는 개념이 널리 인정받게 되었다. 따라서 중추 생체시

계가 전반적인 페이스메이커의 역할을 하지만 실제로 조직 및 기관 특이적인 생리적 리듬의 생성에서는 국부시계가 중요한 역할을 담당할 것이라 믿어지고 있다. 즉, 신경내분비 시스템의 조절 과정에서도 중추시계의 직접적인 제어뿐만 아니라 내분비선 자체가 보유하는 국부 생체시계가 호르몬의 일주기적 합성 및 분비라는 생리적 출력에 중요한 역할을 담당할 가능성이 시사된 것이다.

부신 피질 GC의 일주기 리듬

1. 시상하부-뇌하수체-부신 신경내분비축과 GC 일주기 리듬

생명체의 항상성을 저해하는 다양한 요인들을 총칭하여 스트레스(stress)라고 한다. 고등생물은 주로 교감자율신경계와 더불어 뇌 시상하부의 부신피질자극호르몬 방출호르몬(corticotropin-releasing hormone, CRH)-뇌하수체의 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)-부신을 잇는 신경내분비축(hypothalamus-pituitary-adrenal neuroendocrine axis, HPA 신경내분비축)을 통해 다양한 스트레스에 대하여 반응한다. 부신에서 합성·분비되는 스테로이드성 호르몬인 GC는 이러한 HPA 신경내분비축의 최종 작용 호르몬으로서 스트레스 반응 과정에서 다양한 표적 조직에 작용하여 그 생리적 기능을 조율함과 동시에, 상위 단계 호르몬들에 대한 음성 피드백 작용을 함으로써 스트레스 반응의 적절한 종료에 핵심적인 역할을 수행한다 [10]. GC는 부신 피질, 특히 zona fasciculata 및 zona reticularis 영역의 스테로이드 합성 세포들에 의해 합성·분비된다. GC 역시 다른 스테로이드 호르몬들처럼 스테로이드 합성 세포의 미토콘드리아에서 콜레스테롤의 변형 과정을 통해 생합성된다. 즉, 세포 내로 흡수된 콜레스테롤은 우선 steroidogenic acute regulatory protein (StAR) 단백질에 의해 미토콘드리아 내부로 이동되며, 이후 일단의 효소군의 연쇄 작용에 의해 콜레스테롤의 잔기가 순차적으로 변형되어 인간을 포함한 영장류의 경우는 코티솔(cortisol), 그리고 생쥐와 같은 설치류에서는 코르티코스테론(corticosterone, CS)과 같은 GC로 만들어진다 [11].

스트레스에 대한 신속한 반응성과 더불어 나타나는 GC의 두드러진 특징은 약 하루 주기의 일주기 리듬을 가진다는 사실이다. 즉, 스트레스가 존재하지 않는 상황에서도 GC의 분비는 밤낮에 따라 두드러진 차이를 보이는데, 멜라토닌과 더불어 GC는 확연한 일주기 리듬을 가지는 대표적인 호르몬으로 알려져 있다. 일반적으로 활동기에는 스트레스와는 무관하게 GC의 분비가 스트레스 상황에 비견될 만큼 증가되며, 반대로 휴식기에는 기저 수준의 분비 양상을 나타낸다. 즉, 주행성인 사람의 경우는 낮에 GC의 분비가 높아지고, 반대로 밤 동안은 낮은 수준의 혈중 GC 농도를 나타내는 반면, 야행성 설치류의 경우는 정반대의 양상을 보인다. 이러한 GC의 일주기 기성은 최근까지도 SCN 중추 생체시계가 HPA 신경내분비축 및 자율신경계를 직접 제어함으로써 이루어질 것이라 믿어져 왔다. 즉,

SCN에 있는 일주기 중추시계가 CRH 신경호르몬의 일주기 리듬을 유도하여 하위단계의 ACTH 및 GC의 일주기 리듬을 순차적으로 유발하거나, 자율신경계를 통해 부신 수질의 카테콜아민 분비를 제어함으로써 부신 피질의 GC 일주기 리듬이 유도된다는 설명이다. 하지만 1) CRH나 ACTH의 일주기적 변화가 GC처럼 확연하지 않고 [12,13], 2) 특히 뇌하수체를 제거한 후 일정량의 ACTH를 투여하더라도 GC의 일주기 리듬이 지속되며[14], 3) 심지어 1960년대 행해진 초기 연구에서 체외 배양된 부신 절편에서도 GC 합성 및 분비의 일주기성이 관찰되는[15] 등 부신의 일주기 리듬을 생성하는 분자 기작은 오랫동안 신경내분비학 분야의 미해결 과제로 남아 있었다.

2. 부신 생체시계와 GC 일주기 리듬

일주기 생체시계에 대한 이해가 증진됨에 따라 GC 일주기 리듬의 분자 기작에 대한 앞서 언급한 전통적인 견해가 가지는 문제점들을 해결하기 위한 새로운 발견과 가설이 제시되고 있는데, 특히 많은 최신 연구들이 부신에 존재하는 국부 생체시계의 중요성에 초점을 맞추고 있다. 다른 말초 조직 및 기관의 경우와 마찬가지로 부신 역시 생체시계 유전자들이 설치류와 영장류 모두에서 높은 수준으로 발현되고 있으며, 아울러 부신에서 세포 대사 활성화에 관여하는 많은 유전자들이 일주기적인 발현 양상을 보인다는 사실은 이들 부신 생체시계 유전자들이 기능적인 일주기 생체시계 분자 네트워크를 구성하고 있다는 사실을 시사한다[12]. 또한 빛 자극은 SCN 중추 생체시계와 부신 수질을 연결하는 자율신경계를 통해 HPA 신경내분비축과는 독립적으로 GC의 분비를 조절할 뿐만 아니라, 동시에 부신 피질의 생체시계를 재설정하여 중추 생체시계에 동기화할 수 있다는 사실이 최근 보고되기도 하였다[16]. 이러한 맥락에서 부신에 대한 자율신경계의 작용과 부신 자체의 국부 생체시계가 ACTH에

대한 부신 피질의 반응성에서 나타나는 일주기성에 관여할 것이라는 주장이 제기되고 있다. 하지만 최근 규명된 새로운 기작 역시 외부 입력 신호와 무관하게 부신이 내재적으로 가지는 일주기성을 충분히 설명하지 못하고 있으며, 여전히 부신의 일주기 리듬을 SCN 중추 생체시계 및 HPA 신경내분비축에 의존적인 현상으로 보는 견해를 벗어나지 못하고 있었다.

본 연구진은 최근 GC 일주기 리듬의 새로운 분자적 동인으로서 기존의 견해와는 차별적인 부신 피질 자체의 내인성 메커니즘을 새로이 규명하여 학계에 보고하였다[13]. 부신 국부 생체시계가 보다 직접적으로 GC의 일주기적 합성과 분비에 관여할 것이라는 가설을 바탕으로 생체시계 분자 네트워크와 부신 스테로이드 합성 경로 사이의 핵심적인 연결고리를 발견하고 그 분자 조절 기작을 규명한 것이다. 본 연구진의 연구 결과에 의하면 부신 피질의 국부 생체시계는 스테로이드 생합성 과정의 속도 결정 인자로 인정받는 StAR (steroidogenic acute regulatory protein) 유전자의 발현을 전사 수준에서 직접적으로 제어함으로써 일주기적인 GC의 합성을 유도할 수 있다. 부신 StAR 유전자의 발현은 mRNA나 단백질 수준 모두에서 GC의 혈중 농도나 부신 내 GC 함량과 유사한 양상으로 뚜렷한 일주기성을 보인다. 흥미롭게도 부신 StAR 단백질의 일주기적 변화는 낮과 밤이라는 환경 변화가 없는 지속적인 암주기에서도 유지되지만, 생체시계 유전자가 망가진 녹아웃 생쥐들에서는 관찰되지 않는데, 이는 내재적인 분자 생체시계의 제어를 받는다는 것을 의미한다. 이상의 연구 결과와 더불어 SCN과 부신을 연결하는 자율신경계를 차단 하더라도 StAR의 일주기적 발현이 상당 기간 지속된다는 사실은 StAR의 일주기적 발현 조절에서 부신 생체시계가 가장 핵심적인 조절 인자로 작동할 것이라는 점을 시사하는 것이다[13,17].

실제로 생쥐의 StAR의 프로모터상에는 잘 보존된 E-box *cis*-ele-

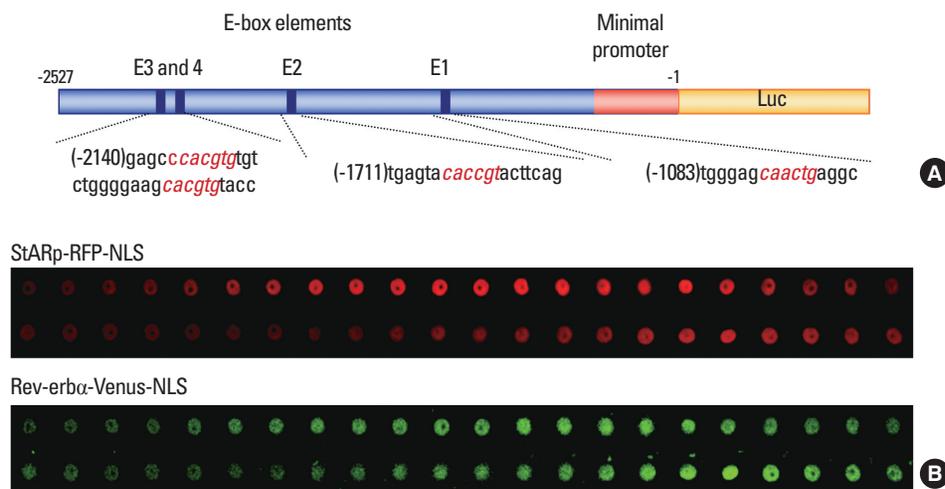


Fig. 2. Circadian rhythm of StAR gene expression. (A) Structure of a murine StAR promoter. E1-4 indicate putative E-box elements. E3 and E4 are functionally recognized by CLOCK:BMAL1 heterodimer. (B) Circadian oscillations of StAR (red) and Rev-erb α (green) promoter activities in Y1 mouse adrenocortical cells recorded at 1-hr of intervals for 2 days.

ment들이 존재하며 그중 5' 말단 부위에 존재하는 2개의 E-box에 CLOCK:BMAL1 이합체가 직접 결합함으로써 StAR 유전자의 일주기적인 발현을 전사 수준에서 조절한다는 사실이 밝혀졌다(Fig. 2A). 실제로 Figure 2B에서 볼 수 있듯이 StAR 프로모터의 주기적 활성화는 생체시계 유전자 중에서도 가장 큰 진폭의 주기성을 보이는 유전자 중 하나인 *Rev-erba*에 비견될 정도로 뚜렷하다. 최근 이루어진 선행 연구 결과에 따르면 인간의 StAR 프로모터의 활성화 역시 CLOCK:BMAL1 이합체에 의해 직접적으로 조절되는데 이는 StAR 유전자를 매개로 한 부신 국부 생체시계의 GC 생합성 경로에 대한 제어 기작이 진화적으로 상당히 보존되어 있을 가능성을 보여준다. 주지할만한 사실은 생쥐 StAR 프로모터의 경우 ACTH와 같은 자극 호르몬에 대한 반응 부위가 3' 말단 쪽 -200 bp 이내에 주로 집중되는 것에 비해 일주기적 조절을 매개하는 *cis*-element의 경우 -2,000 bp 근방에 존재함으로써 프로모터 상의 두 부위 사이의 기능적 상호 작용이 스트레스 반응과 일주기 조절에 의한 GC 합성의 협력적 조절에 깊이 관여할 가능성이 제기된다.

이상의 분자생물학적 연구와 더불어 부신 피질 GC 합성세포에서 관찰되는 생체시계 분자 기구와 스테로이드 생합성 경로와의 연결이 개체 수준에서 GC 일주기 리듬을 생성하는 과정에서도 핵심적인 역할을 담당한다는 사실이 유전자 조작 생쥐 모델을 통해 입증되었다[13]. 부신 피질의 GC 분비세포에서는 ACTH에 대한 수용체가 특이적으로 발현되며, 아울러 BMAL1 단백질의 작용이 생체시계 분자 기구의 기능에 필수적이라는 사실에 착안하여 본 연구진은 ACTH 수용체 프로모터에 의해 BMAL1의 antisense RNA가 발현되도록 하는 형질전환 생쥐(MC2R-AS-BMAL1, BMAS 생쥐)를 제작하였다. BMAS 생쥐에서는 antisense BMAL1 RNA의 과발현에 의한 내재적인 BMAL1 유전자의 발현 억제로 인해 부신 특이적으로 국부 생체시계의 작동이 저해되지만, SCN 중추 생체시계를 포함한 기타

조직에서는 BMAL1의 발현이 정상적으로 이루어지는 새로운 형질 전환 생쥐 모델이다. 중추 생체시계의 작용이 정상적으로 이루어지고 있음에도 불구하고 부신 특이적으로 국부 생체시계의 작용을 저해할 경우 부신 StAR 유전자의 일주기적인 발현이나 그에 따른 부신 GC 합성의 일주기 리듬은 완전히 사라지는 현상이 관찰되었다. 이에 비해 혈중 GC 농도에서 관찰되는 일주기적 변화는 어느 정도 유지가 되지만 그 진폭이 정상 생쥐에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 중추 생체시계와 부신 국부 생체시계가 모두 망가진 일반적인 생체시계 유전자 녹아웃 생쥐의 경우 StAR의 발현과 혈중 GC 농도의 일주기성이 모두 사라지는 현상과는 구별되는 결과로 GC 일주기 리듬의 생성 기작에 대해 다음과 같은 사실을 강력히 시사한다. 우선 혈중 GC의 일주기적 변화는 중추 생체시계에 의한 직접적인 조절과 부신 자체가 보유한 국부 생체시계에 의한 자발적인 메커니즘이 협력적으로 작용하여 나타나는 다인성 조절 현상이라는 사실이다. 특히 SCN이 HPA 신경내분비 축이나 자율신경계를 통해 부신 피질 GC 분비 세포의 ACTH에 대한 반응성이나 분비 효율에 주된 영향을 미칠 가능성이 제시된 데에 비해 부신 생체시계는 주로 StAR 유전자 발현을 제어하여 스테로이드 합성 효율 및 그에 따라 분비 가능한 GC의 함량을 일주기적으로 조절한다. 따라서 CRH나 ACTH와 같은 HPA 신경내분비축 상의 상위 호르몬들보다도 GC의 일주기 리듬이 훨씬 큰 진폭을 가지는 패러독스는 결국 부신 피질에 대한 외부로부터의 분비 조절 신호와 분비 가능한 GC 함량의 일주기적 변조라는 두 가지 변수가 통합적으로 작용하기 때문에 나타나는 현상이라 생각할 수 있다(Fig. 3).

3. GC 일주기 리듬의 생리적 중요성

부신 특이적으로 국부 생체시계가 망가진 BMAS 형질전환 생쥐는 GC 일주기 리듬의 생리적 기능을 연구하기에 기존의 실험모델이 가

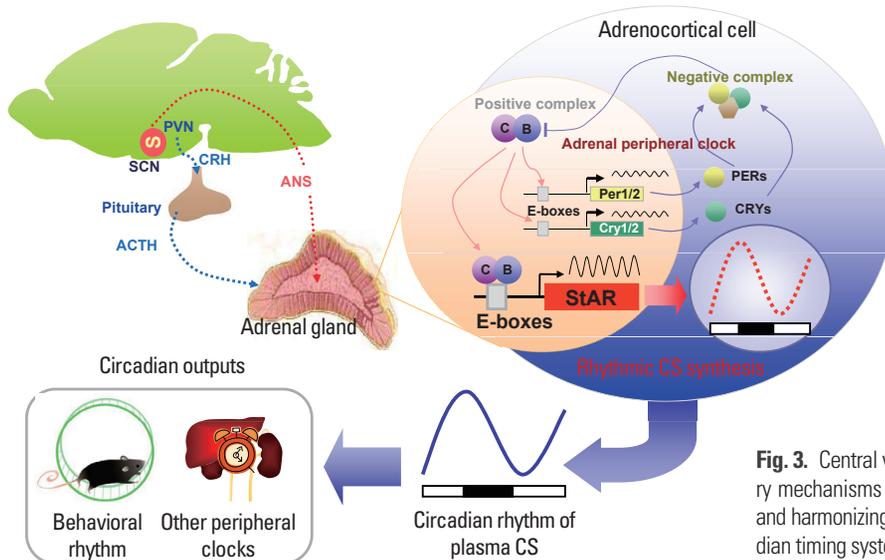


Fig. 3. Central versus adrenal-autonomous regulatory mechanisms underlying the circadian GC rhythm and harmonizing roles of GC in the mammalian circadian timing system (modified from Ref. 13).

지는 단점을 극복하는 큰 이점을 가진다. 지금까지 GC의 일주기 리듬이 가지는 생리적 의의는 주로 외과적 부신 절제 및 외부로부터의 호르몬 보충을 통해 이루어졌다. 이 경우 GC뿐만 아니라 부신 수질에서 분비되는 다양한 카테콜아민계 호르몬들의 분비 역시 제한적일 수밖에 없다. 하지만 BMAS 생쥐 모델에서는 빛 자극이라는 zeitgeber를 제거함으로써 손쉽게 GC 저하증을 유발할 수 있으며, 이에 비해 카테콜아민계 호르몬들의 혈중 농도는 정상적인 범위에서 유지할 수 있는 장점을 가진다. 아울러 부신의 구조적인 통합성 역시 정상적으로 유지되므로, 보다 직접적으로 GC 일주기 리듬의 저하가 유발할 수 있는 생리적 결과들을 검증할 수 있을 것으로 기대된다. 가장 두드러진 측면은 개체 수준의 일주기 생체리듬을 유지하는 과정에서 GC의 일주기 리듬이 가지는 기능이다. 놀랍게도 BMAS 생쥐의 경우 일부 말초 기관에서 BMAL1의 유전자 발현이 정상적으로 이루어지고 있음에도 불구하고 그 하위 단계 PER1 유전자의 일주기적 발현이 현저히 저해되어 있다. 이는 PER1 유전자의 프로모터가 E-box와 더불어 잘 보존된 GC 반응성 *cis*-element (GC-responsive element, GRE)를 가지고 있다는 사실과 일맥상통하는 결과이다[18]. 지금까지는 PER1 유전자의 일주기적인 발현이 주로 E-box에 대한 CLOCK:BMAL1 이합체의 작용 결과라면 GRE는 다양한 말초기관 유래 세포들에 공통적으로 관찰되는 GC에 의한 생체시계 재설정을 매개하는 주요 요소라고 믿어져 왔다. 이에 비해 본 연구 결과는 분자 생체시계의 재설정에 핵심적인 역할을 수행하는 PER1 유전자의 일주기적 발현을 정상적으로 유지하기 위해서는 해당 세포가 가지는 국부 생체시계 분자 네트워크뿐만 아니라 외부로부터 일주기적인 GC 신호전달 역시 요구된다는 사실을 의미한다. BMAS 생쥐에 대한 분석에서 얻어진 이상의 결과와 더불어 언급할 만한 사실은 간세포의 경우 PER1뿐만 아니라 일주기적 발현 양상을 보이는 유전자들 중 상당수가 부신이 절제된 경우 그 일주기성을 잃어버린다는 점이다[19]. 따라서 부신 국부 생체시계가 단순히 대부분의 세포들이 가지는 국부 생체시계 중 하나가 아니라 포유류의 일주기 생체리듬 조절 시스템의 계층적인 구조에서 중추 생체시계와 다른 국부 생체시계를 연결하는 중간자적인 역할을 담당하는 중요한 요소로 보는 것이 타당할 것이다.

유전자 발현 조절에 있어서 부신 생체시계 및 GC의 일주기 리듬이 가지는 이상의 역할과 더불어 뇌기능의 조절에 있어서도 GC 일주기 리듬이 상당한 중요성을 가질 것으로 판단된다. BMAS 돌연변이 생쥐의 행동 양상에서 나타나는 대표적인 이상의 하나는 휴식-활동 주기의 변조라고 할 수 있다. SCN 중추 생체시계가 정상적으로 작동하고 있는 만큼 BMAS 생쥐가 보이는 활동성(locomotor activity)의 일주기적 양상은 정상 생쥐의 경우와 유사한 주기로 나타나지만 흥미롭게도 활동기 동안의 운동성이 크게 감소하여 결국 휴식-활동 리듬에 있어서 두드러진 진폭의 감소 현상을 나타낸다. 이는 수면 조절의 문제나 운동 조절 기능의 이상에 기인하는 것으로 생

각할 수 있는데, 인간의 GC 분비 이상 질환에서 관찰되는 병리적인 증상과 상당한 유사점을 보인다. 예를 들어 GC의 분비 과다로 유발되는 쿠싱 증후군(Cushing syndrome) 환자에서 혈중 GC 농도가 양적으로 증가해 있을 뿐만 아니라 그 일주기 리듬이 사라진 경우를 흔히 볼 수 있는데 이런 환자들이 우울증과 더불어 수면장애와 같은 일주기 행동 장애를 동반하는 경우가 많다는 점은 주지할 만한 사실이다[20]. 또한 상당수의 만성 피로 증후군(chronic fatigue syndrome) 환자에서 활동기의 혈중 GC 농도가 정상인보다 유의하게 저하되어 기저 수준에 가까운 농도를 보이며, 이 경우 저농도의 GC 보충이 증상을 크게 호전시킨다는 보고가 있는데[21], 이는 BMAS 생쥐가 보여주는 저활동성의 양상과 일맥상통하는 보고이다. 결국 이상의 결과는 정상적인 GC의 일주기 리듬이 뇌기능의 제어를 받는 휴식-활동의 일주기 리듬의 구현에서도 상당한 중요성을 가진다는 사실을 직접적으로 보여주는 예라고 할 수 있다. 따라서 GC가 물질대사, 면역조절 및 뇌기능 등 다양한 생리 기능에 폭넓은 영향을 미친다는 사실을 고려할 때 후속 연구에서 이들을 대상으로 GC 일주기 리듬이 가지는 생리적 의의 및 역할에 대한 접근이 우선적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

신경내분비 시스템의 Ultradian Rhythm: 시상하부 GnRH 신경호르몬

1. 시상하부 GnRH의 맥동성

신경내분비 조절에서 일주기 리듬과 더불어 반드시 고려되어야 할 측면이 바로 호르몬의 맥동성(pulsatility), 즉 아일주기 리듬(ultradian rhythm)이다. 하루보다 짧은 주기를 일컫는 ultradian rhythm은 많은 호르몬의 분비, 특히 생식소자극호르몬 방출호르몬(GnRH)을 비롯하여 성장호르몬(GH), 부신피질자극호르몬 방출호르몬(CRH), 갑상선자극호르몬(TSH), 프로락틴(prolactin), 옥시토신(oxytocin) 등 대부분의 호르몬 분비에서 관찰된 바 있다[22]. 이 중 가장 심도 깊은 연구가 행해진 GnRH의 맥동적 분비는 그 표적 기관 뇌하수체 전엽의 생식소 자극호르몬 분비세포(gonadotrope)의 기능을 제어함으로써 정상적인 생식 기능의 발생 및 유지에 핵심적인 요소이다. 1970년대에 Knobil 박사 연구진에 의해 혈중 LH 농도의 맥동성이 관찰됨으로써 인식되기 시작한 신경호르몬 맥동성의 문제는 이어 1980년대 동 연구진이 원숭이 모델에서 수행한 기념비적인 실험들을 통해 그 중요성이 극명히 알려지게 되었다[23]. 예컨대 시상하부 전엽의 손상을 통해 생식 기능이 마비된 원숭이에 맥동적으로 GnRH를 주입하면 생식 기능의 복원을 유도할 수 있으나, 동량의 GnRH를 일정한 농도로 주입하였을 경우에는 이러한 효과가 나타나지 않은 것이다.

그로부터 현재에 이르기까지 GnRH 맥동성의 생물학적 동인을 지칭하는 이른바 'GnRH 맥동 발전기(GnRH pulse generator)'의 분

자·세포생물학적 정체를 규명하고자 많은 노력이 경주되어 왔다. 이에 대해 그간 많은 주장들이 제기되어 왔으나, 유전자 발현의 관련성에 따라 non-genomic과 genomic 메커니즘으로 분류할 수 있다 [24]. Non-genomic 메커니즘은 분비 수준의 조절을 통해 GnRH 맥동 발진기가 운영된다는 가설로서, GnRH 신경세포의 전기적 활성, 세포내 칼슘 농도의 변화, cAMP 등 2차 신호전달자의 농도 변화들이 그 후보로 제안되고 있다. 이에 비해 genomic 메커니즘은 GnRH 유전자 발현의 맥동성이 중요한 역할을 할 수 있다는 가설이다. 그동안 많은 연구자들에 의해 시상하부의 전기생리학적 특성 및 세포내 칼슘의 맥동성 등 non-genomic 기작에 대한 연구가 활발히 이루어져왔으나, 기술적인 한계로 말미암아 상당한 개연성에도 불구하고 genomic 메커니즘에 대한 연구는 상대적으로 진척되지 못한 상황이었다. GnRH 신경세포에서 유래한 세포주를 대상으로 단일 세포 수준에서 GnRH 프로모터 활성이 맥동적이라는 사실[25]과 함께 유전자 발현의 맥동성과 exocytosis와의 연관성[26]이 Florida 대학의 Frawley 교수팀에 의해 보고된 것이 근래에 이루어진 genomic 메커니즘에 대한 주목할 만한 연구의 거의 전부라 할 수 있다. 하지만 상기 연구는 정상적인 신경세포와 달리 세포분열이 가능한 불사

화된 세포주(immortalized cell line, GT1 세포주)를 대상으로 하였고, transient transfection법을 기본으로 한다는 점 등 방법론상의 한계로 인하여 추가적인 연구가 거의 이루어지지 못한 상황이다.

2. GnRH 유전자 발현의 ultradian rhythm

최근 다양한 생체리듬의 분자생물학적 연구 기법과 실시간 세포 이미징 기술의 비약적인 진보에 힘입어 유전자 발현의 동역학적 분석 기술이 급속히 발전하였다. 해당 분야의 발전은 단일 세포 및 세포 군에서의 유전자 발현을 실시간으로 측정하는 기술로서 luciferase 리포터가 발생하는 생체인광을 초고감도의 charge coupled device (CCD) 카메라를 이용하여 정량적으로 이미징하는 것을 근간으로 한다. 이 기술은 배양 세포주뿐 아니라 일차 배양 세포, 조직 배양, 나아가 생체에 이르기까지 다양한 실험 모델에 적용되기 시작하였다. 본 연구진은 GnRH 프로모터에 의해 유도되는 destabilized luciferase 리포터(GnRHp-dsLuc)를 이용하여 형질전환 생쥐를 제작하고, 이를 실시간 생체인광 모니터링 시스템을 이용하여 이미징함으로써 시상하부 신경회로망 내에 존재하는 GnRH 신경세포로부터 GnRH 유전자 발현을 실시간으로 측정·분석하고자 하였다(Fig. 4A, B).

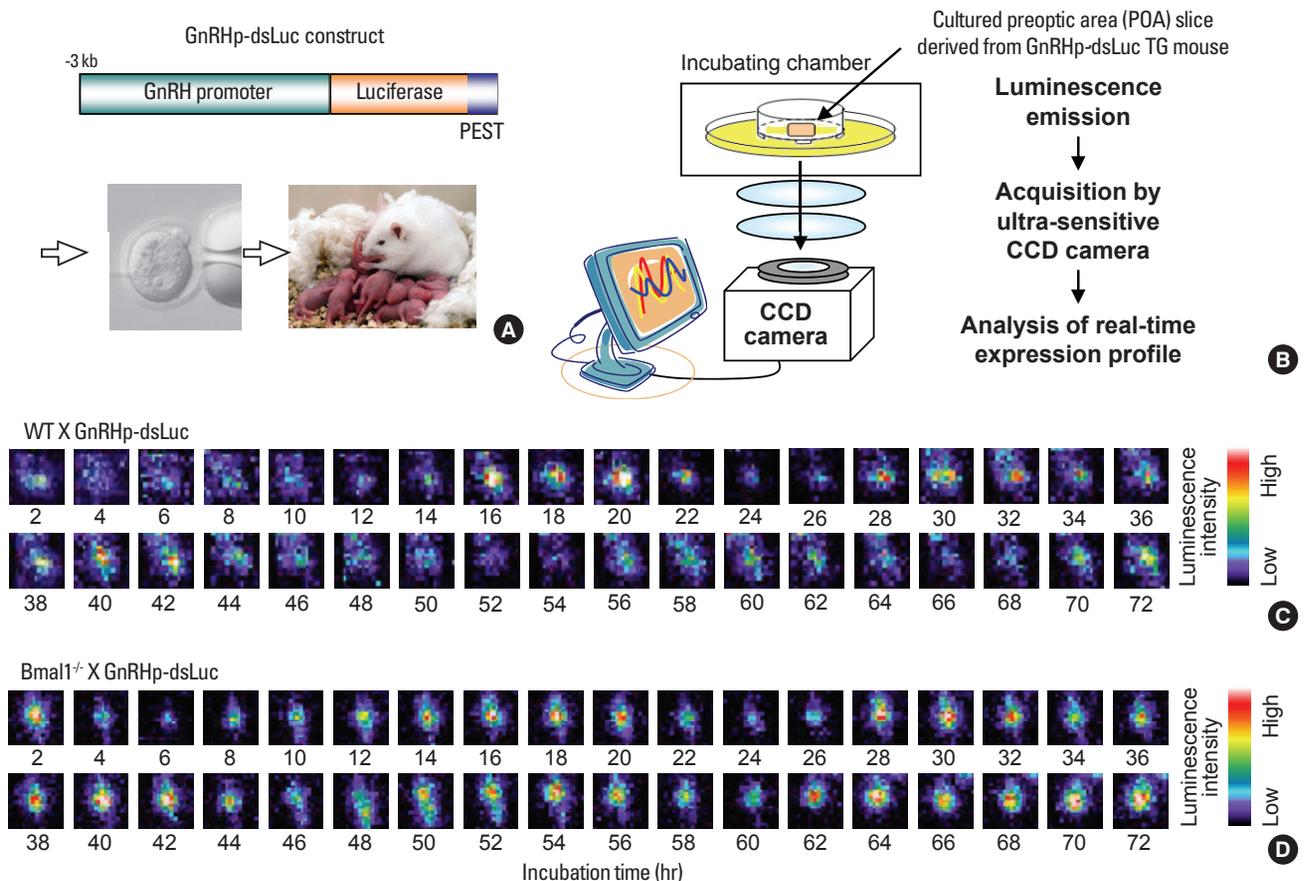


Fig. 4. Ultradian rhythm of hypothalamic GnRH gene expression. (A) Generation of GnRHp-dsLuc transgenic mice. (B) A schematic representation of real-time bioluminescence measurement system. (C, D) Pulsatile GnRH promoter activities in cultured hypothalamic slices from both wild-type (C) and *Bmal1*^{-/-} (D) mice.

GnRH 신경세포가 다수 분포하는 것으로 알려진 시상하부 전시각영역(preoptic area, POA)의 뇌절편 배양에서 수행된 실시간 생체인광 영상 분석은 단일세포 수준의 GnRH 프로모터 활성이 다소 불규칙하기는 하나 6-12시간의 주기를 가지고 아일주기적으로 진동한다는 사실을 극명히 보여 주었다(Fig. 4C). 이렇게 측정된 개별 신경세포 수준에서 맥동적인 GnRH 유전자 발현 주기는 실제 GnRH 호르몬의 분비 주기로 알려진 1-2시간에 비해서는 상당히 긴 편이다. 이는 개별 세포 수준에서 일어나는 유전자 발현만으로는 전체 세포 군의 합으로써 발현되는 호르몬 분비를 직접적으로 설명하기에 부적합할 수 있다는 점을 시사한다. 하지만 흥미롭게도, POA 뇌절편에서 발견되는 다수의 GnRH 신경세포 집단을 대상으로 그 동기화의 통계적 분석(synchronization index) 결과, 이들이 1-2 시간 주기의 동기화 경향을 보였다. 이는 네트워크 수준에서 GnRH 신경세포의 유전자 발현이 동기화되어 새로운 주기(약 1-2시간)를 형성하고, 이것이 전체 세포 활동의 집단적 합으로서 형성되는 정중용기(median eminence)에서의 맥동적 GnRH 분비와 관련된 가능성을 제기한다고 할 수 있다.

나아가 본 연구진은 맥동적인 GnRH 유전자 발현의 분자적 동인을 밝히고자 최근 GnRH의 상위조절자로 주목받는 시상하부 신경펩타이드인 kisspeptin이 맥동적인 GnRH 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 그 결과 kisspeptin이 protein kinase C (PKC) 신호전달 경로에 의존적인 기작을 통해 아일주기성 GnRH 프로모터 활성의 진폭을 크게 강화하며, 동시에 다수의 GnRH 신경세포들이 가지는 아일주기적 유전자 발현의 상을 동기화할 수 있다는 사실을 발견하였다. 특기할만한 점은 kisspeptin의 분비 역시 여타 신경호르몬과 마찬가지로 약 1시간의 맥동성을 가진다는 점이다 [27]. 생리적인 상황을 최대한 모사하고자 본 연구진은 1시간의 주기로 kisspeptin을 맥동적으로 처리한 결과, 놀랍게도 개별 GnRH 신경세포에서 kisspeptin의 맥동성을 따라 GnRH 유전자 발현이 증가하며, 이를 통하여 60% 이상의 세포가 동기화하는 결과를 얻을 수 있었다. 이를 통해 본 연구진은 kisspeptin이 PKC 신호전달 경로를 통하여 GnRH의 분비 수준에서뿐만 아니라 유전자 발현의 맥동성을 강화한다는 사실을 처음으로 규명하였으며, 특히 산재한 GnRH 신경세포들에 강력한 동기화 신호로 작용한다는 사실을 입증하였다.

그럼에도 불구하고 GnRH 유전자 발현에서 드러난 ultradian rhythm의 분자적 동인은 여전히 많은 연구를 필요로 하는 실정으로 이런 맥락에서 대표적인 생물학적 분자 진자인 일주기 생체시계와 GnRH 유전자 발현의 아일주기성 사이의 상관관계를 규명하고자 하였다. 특히 이러한 가설은 일주기 생체시계가 망가진 녹아웃 생쥐에서 생식 기능이 크게 저하된다는 기존의 연구에 비추어 상당한 가능성이 기대되었다. 하지만 기대와는 달리 일주기 생체시계의 핵심 분자가 결여된 BMAL1 유전자 적중 생쥐의 경우에도 기저 수준의 GnRH 프로모터 활성의 맥동성 및 동기화 수준에서 정상 생쥐

와 별다른 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 4D). 뿐만 아니라 맥동적 kisspeptin 처리에 의한 동기화 수준에서도 관측 가능한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 이상의 결과는 일주기 생체시계와는 독립적인, 아직 밝혀지지 않은 아일주기성 분자 진자의 존재 가능성을 시사하는 것이라 하겠다.

결론 및 전망

분자 생체시계 및 이에 기반한 일주기 생체리듬은 분자·세포 수준에서 다양한 생명 현상의 기반이 되는 핵심 분자 기구로서 다양한 분야의 연구자들로부터 각광을 받고 있다. 실제로 물질 대사나 심혈관계 활성 같은 생리적 관점에서부터 암을 비롯한 다양한 병리적 현상에 이르기까지 생체시계의 관련성이 속속 밝혀지면서 최근에는 생명 현상의 해석에 있어서 생체리듬 및 생체시계를 중시하는 시간생물학(chronobiology)의 패러다임이 더욱 확장되고 있는 추세이다. 신경내분비학이 다루는 많은 신경호르몬이나 신경펩타이드들이 본질적으로 다양한 주기의 리듬을 나타내고 있으며, 이들이 개체 수준에서 많은 생리 작용을 조절하는 핵심 조절자라는 사실을 고려한다면, 신경내분비학이야말로 시간생물학이라는 새로운 패러다임과의 접목이 필수적인 분야라고 할 수 있을 것이다. 아울러 신경호르몬의 합성 및 분비 조절의 동역학적 특성에 대한 분자세포생물학적 연구는 기확립된 일주기 생체시계에 비해 상대적으로 연구가 미진했던 ultradian 및 infradian rhythm을 관장하는 새로운 분자 진자의 발굴 및 그 조절 메커니즘 연구로 이어질 수 있는 신경내분비 시스템에서 선도 분야가 될 가능성이 매우 크다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 21세기 프론티어 연구개발사업인 뇌기능활용 및 뇌질환치료기술 개발연구사업단의 연구비 지원(과제번호: 2010K000834)에 의해 수행되었으며, 저자 중 정수영은 교육과학기술부 BK21사업(서울대학교 생명과학 인력양성사업단)의 지원을 받았습니다.

참고문헌

1. Stratmann M, Schibler U: Properties, entrainment and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms* 21:494-506, 2006
2. Ko CH, Takahashi JS: Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15:R271-R277, 2006
3. Gallego M, Virshup DM: Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:139-148, 2007
4. Jung H, Choe Y, Kim H, Park N, Son GH, Khang I, Kim K: Involvement of CLOCK:BMAL1 heterodimer in serum-responsive mPer1 induction

- tion. *Neuroreport* 14:15-19, 2003
5. Shim HS, Kim H, Lee J, Son GH, Cho S, Oh TH, Kang SH, Seen DS, Lee KH, Kim K: Rapid activation of CLOCK by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep* 8:366-371, 2007
 6. Lee Y, Lee J, Kwon I, Nakajima Y, Ohmiya Y, Son GH, Lee KH, Kim K: Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock. *J Cell Sci* 123:3547-3557, 2010
 7. Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K, Lee KH: BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol* 26:7318-7330, 2006
 8. Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, Lee KH, Kim K: Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol* 28:6056-6065, 2008
 9. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937, 1998
 10. Chrousos GP, Kino T: Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress* 10:213-219, 2007
 11. Stocco DM: The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164:247-253, 2000
 12. Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, Hoffmann MW, Eichele G: The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab* 4:163-173, 2006
 13. Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, Lee HW, Choi S, Sun W, Kim H, Cho S, Lee KH, Kim K: Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20970-20975, 2008
 14. Meier AH: Daily variation in concentration of plasma corticosteroid in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 98:1475-1479, 1976
 15. Andrews RV, Folk GE Jr: Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comp Biochem Physiol* 11:393-409, 1964
 16. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H: Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2:297-307, 2005
 17. Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC: Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1128-R1135, 2006
 18. Koyanagi S, Okazawa S, Kuramoto Y, Ushijima K, Shimeno H, Soeda S, Okamura H, Ohdo S: Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol Endocrinol* 20:573-583, 2006
 19. Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N: Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res* 12:191-202, 2005
 20. Carroll T, Raff H, Findling JW: Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:344-350, 2008
 21. Cleare AJ: The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome. *Endocr Rev* 24:236-252, 2003
 22. Gan EH, Quinton R: Physiological significance of the rhythmic secretion of hypothalamic and pituitary hormones. *Prog Brain Res* 181:111-126, 2010
 23. Knobil E: Remembrance: the discovery of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator and of its physiological significance. *Endocrinology* 131:1005-1006, 1992
 24. Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS: Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 24:79-93, 2003
 25. Nuñez L, Faught WJ, Frawley LS: Episodic gonadotropin-releasing hormone gene expression revealed by dynamic monitoring of luciferase reporter activity in single, living neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9648-9653, 1998
 26. Vazquez-Martinez R, Shorte SL, Faught WJ, Leamont DC, Frawley LS, Boockfor FR: Pulsatile exocytosis is functionally associated with GnRH gene expression in immortalized GnRH-expressing cells. *Endocrinology* 142:5364-5370, 2001
 27. Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E: An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149:4151-4157, 2008