

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440169

研究課題名(和文) グレリン - モチリン系による消化管運動調節機構に関する比較生物学的研究

研究課題名(英文) Comparative study for gastrointestinal motor stimulating actions of ghrelin and motilin

研究代表者

北澤 多喜雄 (KITAZAWA, Takio)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50146338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類と鳥類に存在するモチリンまたはグレリンを介する消化管運動調節機構が両生類と魚類にも存在するの機能を、分子生物学的実験から明らかにした。ウシガエル、アカハライモリ、ゼブラフィッシュではグレリンによる著明な収縮作用は認められなかった。このことはグレリンによる消化管収縮刺激作用には種差があり、グレリンの消化管運動調節機構が魚類から哺乳類まで保存されている役割でないことを示唆している。一方、モチリンはウシガエル、ゼブラフィッシュ消化管で収縮を誘起したことから、グレリンとは対照的にモチリンによる消化管運動調節機構が魚類、両生類にも存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin and motilin are gut peptides that regulate the gastrointestinal motility of mammals and birds. The aim of this study is to clarify the function of motilin/ghrelin on gastrointestinal contractility of amphibians and fish using isolated muscle strips. Homologous ghrelin did not change the contractility of amphibians (bullfrog and Japanese fire belly newt) and fish (zebrafish) gastrointestinal tract, suggesting that the motor stimulating action of ghrelin is not conserved across vertebrates. On the other hand, motilin-mediated gastrointestinal motor regulating system is possible to present in the bullfrog and zebrafish but its physiological significance should be studied in future.

研究分野：消化管薬理学

キーワード：グレリン モチリン 消化管 収縮作用 脊椎動物 グレリン受容体 モチリン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1)モチリンは1970年代にブタ腸粘膜から分離された22個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで消化管収縮を活性化して、ヒト、イヌおよびスunksでは空腹期に出現するinterdigestive migrating contraction (IMC)のmediatorと考えられている。モチリンは齧歯類(マウス、ラット)ではリガンド、受容体の両方が偽遺伝子化しており機能的なペプチドや受容体を作り出すことができない。これらの動物ではモチリンと類似したペプチドであるグレリンが消化管運動の調節に関与していることがわかっている。グレリンはモチリンとは異なり胃粘膜で合成、分泌されるペプチドでほぼ全ての哺乳動物に存在することが証明されており、growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a)に作用し種々の生理機能を調節している。即ち、現在、哺乳動物はグレリンのみが存在する動物種(齧歯類、ラット、マウスなど)とグレリン、モチリンの両方が存在する動物種(ヒト、イヌ、スunks、ウサギ等)にわけることができる。グレリンとモチリンが存在するイヌやスunksでは両ペプチドが相互的に消化管運動を調節していることが明らかになっている。

(2)グレリンは哺乳動物以外の脊椎動物(魚類から鳥類まで)の消化管(特に胃)にも広く存在し、成長ホルモン分泌を調整してエネルギー代謝、グルコース代謝や消化管運動調節に関与する可能性が示唆されている。我々のこれまでの検討ではグレリンがニワトリの消化管運動を部位依存性に調節する可能性を示したが、魚類(キンギョ、ニジマス)では消化管収縮はグレリンでは影響を受けなかった。対照的にモチリンは、鳥類(ニワトリ、七面鳥)でその存在が確認されているのみであり(小腸の収縮を調節)、爬虫類以下の脊椎動物(両生類、魚類)ではモチリンの存在も含めこのペプチドの消化管機能に関する検討は全く行われていないのが実情である。

2. 研究の目的

今回の研究では鳥類以下の脊椎動物の胃腸管収縮の調節にモチリンおよびグレリン系が関与するの否かを明らかにすることを目的として、魚類(ゼブラフィッシュ、キンギョ)と両生類(ウシガエル、アカハライモリ)の摘出消化管標本の収縮活性におよぼす両ペプチドの作用を検討した。また、グレリン、モチリンおよびそれら受容体の存在の有無を遺伝子、蛋白質レベルでの解析から明らかにした。

3. 研究の方法

(1)収縮実験:魚類(ゼブラフィッシュ、キンギョ)と両生類(ウシガエル、アカハライモリ)を安楽致死させて、正中切開により胃から結腸までの消化管を摘出した。ウシガエ

ルでは胃からは縦走筋と輪走筋方向の条片を切り出し、小腸からは縦走筋方向の条片を作製した。アカハライモリでは胃で輪走筋標本を作製したが、他の部分は腸管を丸ごと標本として使用した。一方、魚類では胃が特定できなかったため、上部の胃相当部位(腸管膨大部)をそのまま実験に供した。作製した平滑筋標本は、それぞれの動物種用に調節した生理的塩類溶液内に懸垂し混合ガス通気下、23℃で実験を行った。いずれの標本も自発収縮を示し、脱分極刺激(high-K刺激)で著明な収縮が認められた。グレリン、モチリンは浴槽中に直接滴下しその収縮活性を測定、解析した。グレリンはそれぞれの動物種で同定されているペプチドを合成して使用した。一方、モチリンは主にヒトモチリンを用いたが、魚類で存在が示唆されているモチリン様ペプチド(zebrafish motilin-like peptide, zfMOTLP, HIAFFSPKEMRELREKE)も合成して使用した。

(2)分子生物学的解析(受容体 mRNA の解析、発現細胞の作製):各部位の消化管から得られたcDNAを解析しGHS-R1aまたはモチリン受容体 mRNA の発現をRT-PCR法により明らかにした。また、ゼブラフィッシュにおいてはゼブラフィッシュモチリン受容体をHEK293細胞に発現させてモチリンやzfMOTLPの作用を検討した。

(3)免疫組織化学的検討:哺乳類およびニワトリのモチリンを染色可能な抗体(モチリンC末端を認識)を使用しウシガエル消化管にモチリン様物質が存在するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1)両生類

ウシガエル:ウシガエルの胃腸管標本はウシガエルグレリン($10^{-6}M$)の適用によっても著明な収縮を起こさなかった。このことはラットグレリンにおいても同様であった。一方、カルバコールやサブスタンスPの適用では著明な収縮が誘起された。特にサブスタンスPは $10^{-10}M$ から収縮を誘起した。ニューロテンシンでも収縮が誘起されたがこの反応は小腸標本のみで観察された。GHS-R1a mRNA は消化管部位に関係なくほぼ均一に発現していたが、下部小腸では粘膜層での発現が筋層よりも多かった。これらのことから、ウシガエル摘出腸管標本はグレリンに対して感受性を示さないこと、その原因が受容体の発現が低いことに起因しないことが明らかになった。ヒトモチリン($10^{-8}M$ - $10^{-6}M$)は、ウシガエルの上部小腸(12指腸に相当)のみを濃度依存性に収縮させた。他の消化管部位(胃条片、中間部、下部小腸)では収縮は誘起されなかった。ヒトモチリンによる収縮作用は哺乳動物モチリン受容体の遮断薬GM109によっては抑制されなかった。ウシガエル消化管の免疫組織化学的検討から、用いた抗体に反応するモチリン様免疫活性陽性物質が存在する可

能性は低いと考えられた。これらの成績から、ウシガエルにはモチリンによる小腸収縮調節機構が存在する可能性が示唆された。しかし、モチリンやモチリン受容体の構造には哺乳動物や鳥類との違いがあることが推察され、今後の解析が必要である。

アカハライモリ：アカハライモリの摘出胃腸管標本もイモリグレリン、ラットグレリンに対して 10^{-6}M でも著明な収縮を誘起しなかった。しかしながら、カルバコールやサブスタンス P などでは著明な収縮を確認することができた。GHS-R1a mRNA はウシガエルと比較して明らかに低いレベルであった。また、ウシガエル小腸と異なりアカハライモリではヒトモチリンによっても収縮反応は観察されなかった。これらのことから、両生類の消化管収縮がグレリンによって影響を受けないことが明らかになった。モチリンの反応性には両生類でも種差がある可能性が示唆された。モチリン受容体の構造がウシガエルとアカハライモリで異なっている可能性が推察された。

(2)魚類

ゼブラフィッシュ：既報をもとにして zfMOTLP を合成してその性質を検討した。ウサギやニワトリ腸管を用いた検討でこの物質はヒトモチリンに比較して約 3000 倍親和性が低いモチリン受容体の作動薬であることがわかった。ゼブラフィッシュ腸管において zfMOTLP は 10^{-6}M - 10^{-5}M で収縮を誘起したが、この収縮はアセチルコリン (10^{-4}M) 収縮の 20% 程度と低かった。ヒトモチリンも 10^{-5}M の高濃度で zfMOTLP とほぼ同程度の収縮を誘起した。一方、ゼブラフィッシュモチリン受容体の発現細胞において zfMOTLP は 10^{-9}M の低濃度から細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を誘起したが、ヒトモチリンは 10^{-7}M まで影響がなかった。このことは、zfMOTLP が低濃度からゼブラフィッシュモチリン受容体を認識できることを示している。消化管標本が zfMOTLP に対して高濃度でわずかな収縮しか起こさなかった原因として、消化管のモチリン受容体の発現量が少ないことが原因ではないかと考え、消化管と中枢神経系のモチリン受容体 mRNA を測定したところ、mRNA の発現はモチリンが収縮を誘起するニワトリ小腸のその 10% 程度であることがわかった。このことから、ゼブラフィッシュの消化管にはモチリンシステムが存在しているものの、その生理的な意義は極めて低いと考えられた。ゼブラフィッシュ消化管ではニジマスやキンギョでの検討と同様にラットグレリンによる反応は認められなかった。

キンギョ：キンギョの腸管膨大部についても zfMOTLP とヒトモチリンの作用を検討したが 10^{-5}M でも著明な収縮が誘起されることはなかった。今後、キンギョにモチリンシステムが存在しているか検討することが必要である。

(3)まとめ

哺乳類（齧歯類を除く）と鳥類（新たにウズラにモチリンシステムが存在することを連携研究者が示した）で存在が確認されているモチリン-モチリン受容体を介する消化管運動の調節機構が両生類と魚類にも存在しているのか検討しウシガエルとゼブラフィッシュでモチリンシステムが存在する可能性を示した。しかし、この調節機構が生理的に意義あるものであるかどうかについてはさらなる検討が必要である。一方、グレリンは摘出消化管レベルでは両生類、魚類で著明な収縮を誘起しなかった。このことはグレリンの消化管収縮刺激作用には動物種差があり、この作用が魚類から哺乳類まで保存されているグレリンの生理的役割ではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Okamatsu G, Kawakami K, Komatsu T, Kitazawa T, Uno Y, Teraoka H.

Functional expression and comparative characterization of four feline P450 cytochromes using fluorescent substrates. *Xenobiotica*. 2017; 印刷中. 査読有. doi:

10.1080/00498254.2016.1257172.

Kitazawa T, Yoshida M, Teraoka H, Kaiya H. Does motilin peptide regulate gastrointestinal motility of

zebrafish? An *in vitro* study using isolated intestinal strips. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017;249:15-23. 査読有. doi: 10.1016/j.ygcen. 2017.02. 014.

Okamatsu G, Komatsu T, Ono Y, Inoue H, Uchide T, Onaga T, Endoh D, Kitazawa T, Hiraga T, Uno Y, Teraoka H.

Characterization of feline cytochrome P450 2B6. *Xenobiotica*. 2017; 47: 93-102. 査読有.

doi:10.3109/00498254.2016.1145754.

Oki Y, Teraoka H, Kitazawa

T. Neuropeptide Y (NPY) inhibits

spontaneous contraction of mouse atrium by possible activation of NPY₁ receptor. *Auto. Autacoid Pharmacol.*, 2017;37 : 23-28. 査読有. doi: 10.1111/aap.12055.

Kitazawa T, Kondo N, Taneike T. Pharmacological characterization of muscarinic receptor subtypes involved in carbachol-induced contraction of chicken proventriculus. *J. Gastroenterol.* 2016;2(1). 1003. 査読有.
<http://smjournals.com/gastroenterology-hepatology/in-press.php>

Kitazawa T, Shimazaki M, Kikuta A, Yaosaka N, Teraoka H, Kaiya H. Effects of ghrelin and motilin on smooth muscle contractility of the isolated gastrointestinal tract from the bullfrog and Japanese fire belly newt. *Gene. Comp. Endocrinol.* 2016;232, 51-59. 査読有. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.12.013

Apu AS, Mondal A, Kitazawa T, Takemi S, Sakai T, Sakata I. Molecular cloning of motilin and mechanism of motilin-induced gastrointestinal motility in Japanese quail. *Gen Comp Endocrinology.* 2016;233:53-62. 査読有. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.05.017.

Nijoukubo D, Tanaka Y, Okuno Y, Yin G, Kitazawa T, Peterson RE, Kubota A, Teraoka H. Protective effect of prostacyclin against pre-cardiac edema caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a thromboxane receptor agonist in developing zebrafish. *Chemosphere.* 2016;156:111-117. 査読

有. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.107

Teraoka H, Okamoto E, Kudo M, Nakayama SM, Ikenaka Y, Ishizuka M, Endo T, Kitazawa T, Hiraga T. Accumulation properties of inorganic mercury and organic mercury in the red-crowned crane *Grus japonensis* in east Hokkaido, Japan. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 ; 122:557-564. 査読有. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.025.

Okamatsu G, Komatsu T, Kubota A, Onaga T, Uchide T, Endo D, Kirisawa R, Yin G, Inoue H, Kitazawa T, Uno Y, Teraoka H. Identification and functional characterization of novel feline cytochrome P450 2A. *Xenobiotica.* 2015;45:503-510. 査読有. doi: 10.3109/00498254.2014.998322.

Kitazawa T, Hiraga T, Teraoka H, Yaosaka N, Kaiya H. Correlation of ghrelin concentration and ghrelin, ghrelin-O-acetyltransferase (GOAT) and growth hormone secretagogue receptor 1a mRNAs expression in the proventriculus and brain of the growing chicken. *Peptides.* 2015;63:134-142. 査読有. doi: 10.1016/j.peptides.2014.11.006.

Teraoka H, Okuno Y, Nijoukubo D, Yamakoshi A, Peterson RE, Stegeman JJ, Kitazawa T, Hiraga T, Kubota A. Involvement of COX2-thromboxane pathway in TCDD-induced precardiac edema in developing zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2014;154:19-26. 査読有. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.04.025.

〔学会発表〕(計6件)

1. 松山勇人、内藤清雄、和田善明、永野宏、齊藤正一郎、酒井洋樹、棚橋靖行、北澤

多喜雄、小森成一、海野年弘、ムスカリン受容体を介した胃粘膜細胞の分化・増殖制御 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月5日から7日、日本大学、藤沢市

2. Kitazawa T, Teraoka H, Kaiya H. Possible regulation of gastrointestinal motility by motilin in zebrafish -an in vitro study using isolated muscle strips- Regulatory Peptide (2016), Rouen France, 2016年7月12日から14日。
3. Kitazawa T, Teraoka H, Kaiya H. What is the general action of ghrelin in vertebrates? Study focused on gastrointestinal motor action. 第93回日本生理学会、2016年3月24日、札幌コンベンションセンター、札幌市
4. 北澤多喜雄、嶋崎未里、菊田歩、八百坂紀子、寺岡宏樹、海谷啓之。ウシガエルとイモリの胃腸管収縮に対するグレリンの効果、日本動物学会第86回大会、2015年9月19日、朱鷺メッセ、新潟コンベンションセンター、新潟市
5. 北澤多喜雄、嶋崎未里、寺岡宏樹、海谷啓之。ウシガエルの消化管収縮におよぼす ghrelin および motilin の影響、第57回日本平滑筋学会、2015年8月27日、山口大学医学部、宇部市
6. Kitazawa T, Teraoka H, Kaiya H. Chicken is a specific and useful animal model to study the functional role of ghrelin and motilin in regulation of gastrointestinal motility. Regulatory Peptide (2014), Kyoto, Japan. 2014年9月7日から9月10日

〔図書〕(計1件)

Kitazawa T, Teraoka H, Harada N, Ochi K, Nakamura T, Asakawa K, Kanegae S, Yaosaka N, Unno T, Komori S and Yamada M. Chapter 13. Regulation of heart contractility by M2 and M3 muscarinic receptors: functional studies using muscarinic receptor knockout mouse. Myslivecek J and Jakubik J (eds), Muscarinic receptor. From Structure to

Animal Models. Neuromethods Vol. 107.
DOI 10.1007/978-1-4939-2858-3_13
@Springer Science+Business Media New York. 2015. 235-259

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤 多喜雄 (Kitazawa Takio)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：50146338

(2) 研究分担者

海谷 啓之 (Kaiya Hiroyuki)
国立循環器病センター研究所・生化学・室長
研究者番号：40300975

寺岡 宏樹 (Teraoka Hiroki)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：50222146

(3) 連携研究者

坂井 貴文 (Sakai Takafumi)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：40235114

(4) 研究協力者

()