

機関番号：16301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590727  
 研究課題名（和文） 消化管ホルモンおよびその受容体からのアプローチによる臓器関連の解析  
 研究課題名（英文） Study of molecular basis of motilin and growth hormone secretagogue receptors  
 研究代表者  
 松浦 文三（MATSUURA BUNZO）  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授  
 研究者番号：80284420

研究成果の概要（和文）：モチリンおよびエリスロマイシンはモチリン受容体に結合し、またグレリンは GHS 受容体に結合し、消化管運動機能調節に重要な役割を果たす。モチリン受容体および GHS 受容体発現細胞やモチリン受容体トランスジェニックマウスを用いて、受容体活性化機構の解析と両者の相互関連を解析した。エリスロマイシンはモチリン受容体の膜貫通部に結合し、作用発現することを明らかにした。またモチリン受容体と GHS 受容体は連動して活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Motilin, erythromycin and ghrelin are important endogenous regulators of gastrointestinal motor function, mediated by the class A G protein-coupled motilin receptor and GHS receptor. We have identified new critical residues in the transmembrane domains of the motilin receptor for erythromycin binding and activity using receptor mutagenesis. We have also generated human motilin receptor transgenic mice, and clarified relationship between motilin receptor and GHS receptor.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：モチリン, グレリン

## 1. 研究開始当初の背景

モチリンおよびエリスロマイシンはモチリン受容体に結合し、またグレリンは growth hormone secretagogue (GHS) 受容体に結合し、消化管運動機能調節に重要な役割を果たしている。

申請者は、ペプチドリガンドのモチリンはモチリン受容体の perimembranous なアミノ酸残基に結合すること、非ペプチドリガンドのエリスロマイシンはこれらのアミノ酸残基とは異なる部位に結合すること、モチリンと

エリスロマイシンの細胞内シグナル伝達系は共通であること、ヒト消化管におけるモチリン受容体と GHS 受容体の発現様式に関してモチリン受容体は消化管の筋層間神経叢と筋細胞に発現し GHS 受容体は粘膜細胞および筋細胞に発現していること、を明らかにしてきた。

しかし、モチリン受容体におけるエリスロマイシンの結合部位、モチリン受容体の消化管運動以外の消化管、肝胆膵、中枢神経系への作用、モチリン受容体と GHS 受容体のクロストーク機構は不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 変異モチリン受容体を用いてエリスロマイシンのモチリン受容体における結合部位を同定する。

(2) ヒトモチリン受容体トランスジェニックマウス(マウス GHS 受容体は natural に発現)を作成し、その形態・機能解析を行う。

(3) モチリン受容体と GHS 受容体のクロストーク機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 変異モチリン受容体を用いたエリスロマイシンのモチリン受容体における結合部位の同定

① Site-directed mutagenesis 法を用いて、モチリン受容体の第一から第七までの膜貫通部の Ala 置換変異受容体の cDNA を作成し、DEAE-dextran 法にて COS 細胞に導入し、一過性に発現させた。

② 一過性に変異受容体を発現させた COS 細胞をモチリン受容体特異抗体で染色し、細胞表面に表出していることを確認した。

③ 一過性に変異受容体を発現させた COS 細胞を用いて、 $^{125}$ I 標識モチリンと  $0-10^{-6}$ M の非標識モチリンを、 $^3$ H 標識エリスロマイシンと  $0-10^{-4}$ M の非標識エリスロマイシンを、競合的に変異モチリン受容体と反応させ、変異受容体の結合能を解析し、モチリン、エリスロマイシン結合に必須のアミノ酸残基の同定を行った。

④ 一過性に変異受容体を発現させた COS 細胞を用いて、 $0-10^{-6}$ M のモチリン刺激下、 $0-10^{-4}$ M のエリスロマイシン刺激下の、細胞内カルシウム濃度変化を Fura-2-AM 系で測定し、モチリン、エリスロマイシン機能発現に必須のアミノ酸残基の同定を行った。

(2) ヒトモチリン受容体トランスジェニックマウスの作成とその解析

① ヒトモチリン受容体 cDNA を組み込んだ CAG promoter を有する plasmid を作成した。

② C57BL/6J JAX 前核期胚の雄性前核へ目的の DNA をマイクロインジェクションし、DNA 注入胚を Crj マウス卵管内に移植した。

③ 分娩後 4 週間目で仔マウス尾を用いて、トランスジーンを確認した。

④ トランスジェニックマウスをエリスロマイシン非投与群と 20mg/日 2 週間投与群に分け、代謝ケージを用いて、体重増加、食餌摂取量、飲水量、便量、尿量、活動量、各組織(消化管、肝、膵、脾、精巢上体脂肪)の重量、各組織像を解析した。

(3) モチリン受容体と GHS 受容体のクロス

## トーク機構の解析

① 野生型モチリン受容体のうち、膜貫通部がそれぞれ保存された GHS 受容体とのキメラ受容体を、site-directed mutagenesis 法にて同一の制限酵素認識部位を導入し、制限酵素で切断後、T4 リガーゼを用いてライゲーションし作成した。

② 変異キメラ受容体を COS 細胞に一過性に発現させ、モチリン、エリスロマイシンあるいはグレリン刺激による細胞内カルシウム濃度変化を FURA-2-AM 系で、またモチリン、グレリンの結合能を競合的結合反応で、測定した。

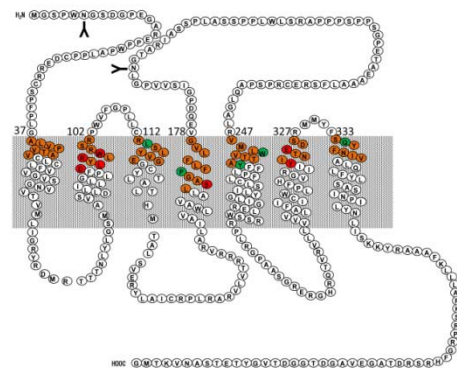
③ 野生型モチリン受容体と GHS 受容体を COS 細胞に共発現し、モチリン、エリスロマイシンあるいはグレリン刺激による細胞内カルシウム濃度変化を FURA-2-AM 系で、またモチリン、グレリンの結合能を競合的結合反応で、測定した。

## 4. 研究成果

(1) 変異モチリン受容体を用いたエリスロマイシンのモチリン受容体における結合部位の同定

① モチリン受容体第 2 膜貫通部の Asp94, Leu95, Try99, 第 4 膜貫通部の Ser169, 第 6 膜貫通部の Glu325 の変異受容体にて、エリスロマイシン特異的な受容体活性化がみられなかった(図 1)。エリスロマイシンはこのアミノ酸残基に結合していることが示唆された。

(図 1) モチリン受容体におけるエリスロマイシン特異的結合部位



● : エリスロマイシン特異的結合部  
● : モチリン、エリスロマイシン両者に必須のアミノ酸残基

(2) ヒトモチリン受容体トランスジェニックマウスの作成とその解析

① ヒトモチリン受容体トランスジェニックマウスの作成に成功した。

② トランスジェニックマウスのエリスロマイシン投与群は非投与群に比して、食餌摂取量、飲水量、便量は増加し、また活動量も増加したが、体重増加は少なかった。

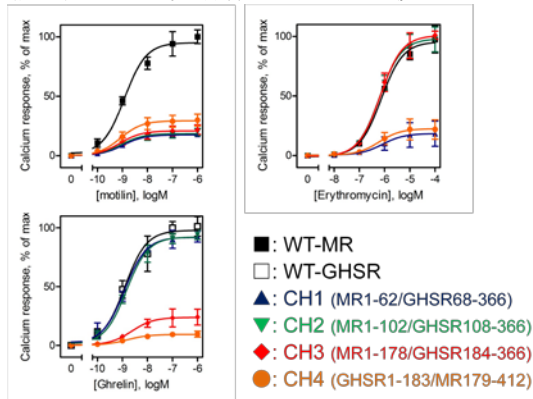
③ トランスジェニックマウスのエリスロマイシン投与群の消化管、肝、膵、脾、精巣上体の重量は非投与群に比して差は見られず、組織学的にも差は見られなかった。

④ エリスロマイシン投与トランスジェニックマウスの血中グレリン分泌動態の解析が今後必要である。

(3) モチリン受容体(MR)と GHS 受容体(GHSR)のクロストーク機構の解析

① MR(1-62) /GHSR(68-366)はグレリンのみに反応, MR(1-102) /GHSR(108-366)はグレリンとエリスロマイシンに反応, MR(1-178) /GHSR(184-366)はエリスロマイシンに反応, しかし GHSR(1-183) /MR(179-412)はモチリンもエリスロマイシンもグレリンも反応しなかった(図2)。

(図2) キメラ受容体の細胞内Ca反応



② モチリン受容体と GHS 受容体の共発現系では、モチリン+グレリン刺激により、細胞内Ca反応の増強がみられた。

以上の結果から、モチリン受容体と GHS 受容体は協調しながら、消化管運動調整に関与していると考えられた。

## 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 11 件)

- ① Ueda T, Matsuura B, Miyake T, Furukawa S, Abe M, Hiasa Y, Onji M: Mutational analysis of predicted extracellular domains of human growth hormone secretagogue receptor 1a. Regul Pept, 査読有, 166: 28-35, 2011.
- ② 松浦文三, 上田晃久, 宇都宮幸子, 布井弘明, 恩地森一: 消化管ホルモン研究の再来. 愛媛医学, 査読無, 29: 7-13, 2010.
- ③ Michitaka K, Hiraoka A, Kume M, Uehara T, Hidaka S, Ninomiya T, Haseba A,

Miyamoto Y, Ichiryu M, Tanihira T, Nakahara H, Ochi H, Tanabe A, Uesugi K, Tokumoto Y, Mashiba T, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M: Amino acid imbalance in patients with chronic liver diseases. Hepatol Res, 査読有, 40: 393-398, 2010.

④ Miyake T, Akbar SM, Yoshida O, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M: Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol, 査読有, 45: 859-867, 2010.

⑤ Kajiwara T, Nishina T, Hyodo I, Moriwaki T, Endo S, Nasu J, Hori S, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M: High orotate phosphoribosyltransferase gene expression predicts complete response to chemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Oncology, 査読有, 76: 342-349, 2009.

⑥ Konishi I, Hiasa Y, Shigematsu S, Hirooka M, Furukawa S, Abe M, Matsuura B, Michitaka K, Horiike N, Onji M: Liver Int, 査読有, 29:1194-1201, 2009.

⑦ Toshimitsu K, Matsuura B, Nagai Y, Miyake T, Ueda T, Furukawa S, Abe M, Hiasa Y, Ebihara K, Onji M: Changes of anthropometric and biological parameters in patients with non-alcoholic steatohepatitis for dietary modification. J Metab Clin Nutr, 査読有, 12: 337-346, 2009.

⑧ Sera T, Hiasa Y, Mashiba T, Tokumoto Y, Hirooka M, Konishi I, Matsuura B, Michitaka K, Uda K, Onji M: Wilms' tumor 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. Eur J Cancer, 査読有, 44: 600-608, 2008.

⑨ Goto A, Uchino S, Noguchi S, Wakiya S, Watanabe Y, Murakami T, Matsuura B, Onji M: NIS mRNA expression level in resected thyroid tissue as a marker of postoperative hypothyroidism after subtotal thyroidectomy in patients with Graves' disease. Endocr J, 査読有, 55: 73-81, 2008.

⑩ Hiasa Y, Kuzuhara H, Tokumoto Y, Konishi I, Yamashita N, Matsuura B, Michitaka K, Chung RT, Onji M: Hepatitis C virus replication is inhibited by 22beta-methoxyolean-

12-ene-3beta, 24(4beta)-diol (ME3738) through enhancing interferon-beta. Hepatology, 査読有, 48: 59-69, 2008.

- ⑪ Tokunaga H, Matsuura B, Dong, M, Miller LJ, Ueda T, Furukawa S, Hiasa Y, Onji M: Mutational analysis of the predicted intracellular loop domains of the human motilin receptor. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol, 査読有, 294: G460-G466, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Matsuura B, Utsunomiya S, Ueda T, Miyake T, Furukawa S, Murakami H, Abe M, Hiasa Y, Onji M: A cross-talk between motilin receptor and growth hormone secretagogue receptor using chimeric construct's expression and co-expression. AGA meeting 2010, 2010.5.1-5., New Orleans, USA.
- ② Matsuura B, Utsunomiya S, Ueda T, Dong M, Miller LJ, Miyake T, Furukawa S, Abe M, Murakami H, Onji M: Critical residues in the transmembrane helical bundle domains of the human motilin receptor for erythromycin binding and activity. AGA meeting 2009, 2009.5.31-6.4., Chicago, USA.
- ③ 松浦文三, 上田晃久, 恩地森一: 消化管運動促進物質モチリン・エリスロマイシンのモチリン受容体におけるシグナル伝達系の解析. JDDW 2008, 2008.10.1-4., 東京.
- ④ Ueda T, Matsuura B, Miyake T, Furukawa S, Hiasa Y, Murakami H, Onji M: Identification of peptide-ligand binding domains of the growth hormone secretagogue receptor. AGA meeting 2008, 2008.5.18-21., San Diego, USA.
- ⑤ Matsuura B, Ueda T, Dong M, Miller LJ, Miyake T, Furukawa S, Onji M: New critical residues in the predicted intracellular loop domains of human motilin receptor. AGA meeting 2008, 2008.5.18-21., San Diego, USA.

[図書] (計 3 件)

- ① 松浦文三, 恩地森一: 肝硬変(NASH を含む). 雨海照祥編: ワンステップ栄養アセスメント応用編. 医歯薬出版, 東京, p28-33, 2010.
- ② 松浦文三, 恩地森一: ダンピング症候群, 便秘, 黄疸. 清野裕, 門脇孝, 中村丁次, 本田佳子編: NST 臨床栄養療法スタッフマニュアル. 医学書院, 東京, p99-115, 2009.
- ③ 松浦文三, 恩地森一: 食事療法. 西原利

治編: NASH 診療 best approach. 中外医学社, 東京, p249-252, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med3/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松浦 文三 (MATSUURA BUNZO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
教授

研究者番号: 80284420

### (3) 研究協力者

上田 晃久 (UEDA TERUHISA)

愛媛大学・大学院

布井 弘明 (NUNOI HIROAKI)

愛媛大学・大学院

Miller LJ

Mayo Clinic Arizona