

平成22年 5月 24日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009 年度
 課題番号：20780211
 研究課題名 (和文) ニワトリのグレリン受容体ファミリーを介する消化管機能調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Molecular characterization of chicken ghrelin receptor superfamily in gut-intestinal tract system.
 研究代表者
 山本 一郎 (YAMAMOTO ICHIRO)
 日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
 研究者番号：00424763

研究成果の概要 (和文)：200 文字

モチリンは消化管ホルモンとして腸のぜん動運動を制御するが、マウス・ラット等の齧歯類はこのモチリンが機能していないことから、小型で汎用性に優れたニワトリを用いたグレリン・モチリンを含めたグレリンペプチドファミリーの共役的な生理作用の解明が必要とされていることから本研究ではニワトリを用いたグレリン受容体ファミリーの消化管機能の解明を行い、他動物種ではみられない独自の調節機構の存在を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Motilin and ghrelin are peptide hormones involved in gastrointestinal motility. GPR38, initially cloned as an orphan receptor, is now considered a specific receptor for motilin. Previously, molecular characterization of the motilin receptor had only been performed in mammalian and fish species. We cloned cDNA for chicken motilin receptor from the duodenum and characterized its primary structure, tissue distribution, and biological activity. Our data suggest that chicken motilin receptor is largely involved in gastrointestinal functions at pre- and post-hatch periods through an intracellular signaling pathway accompanied by an increase in Ca²⁺ levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
平成21年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医・基礎畜産学

キーワード：モチリン、グレリン、受容体、GPCR、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

モチリンは消化管ホルモンとして腸のぜん動運動を制御するが、マウス・ラット等の齧歯類はこのモチリンが機能していないことから、小型で汎用性に優れるニワトリを用いたグレリン・モチリンを含めたグレリンペプチドファミリーの共役的な生理作用の解明が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究はグレリン、モチリンというペプチドホルモンとそれら受容体の生理機能に着目し、両ホルモンの腸管調節機構の解明を目的とするものである。

3. 研究の方法

ニワトリを用い、グレリンおよびモチリン受容体を対象とした分子生物学的手法により研究を行った。

4. 研究成果

グレリン受容体はその構造および性質からスーパーファミリーを形成しており、モチリン受容体 (GPR38/MTL-R)、ニューロメジンU受容体 (GPR66/FM3, FM4/NMUR1, NMUR2)、ニューロテンシン受容体 (NTSR1, NTSR2) および GPR39 はすべて G タンパク質共役型で 7 回膜貫通型構造を有する。疎水性アミノ酸残基が多く含まれる特徴的な膜貫通領域が 7 領域存在し、N 末端領域は細胞外に、C 末端領域は細胞内に存在している。特徴的なのは第 3 と第 4 膜貫通領域に挟まれた細胞内領域に G タンパク質共役に重要な D/ERY モチーフが存在している。それぞれのリガンドが結合する際に重要とされる第 1、第 2 および第 3 細胞外ループ領域は比較的保存性が低いながら、第 1 細胞外領域のグレリン受容体とモチリン受容体は保存性がある。

ニワトリ GHS-R1a は Tanaka らと Geelissen

らのグループにより同時に cDNA がクローニングされた結果、347 アミノ酸残基をコードし、7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であることが推察される。また発現量は少ないが第 6 膜貫通領域を欠く mRNA スプライシングバリエーションとして GHS-R1aV が存在することも明らかとなった。GHS-R1a および GHS-R1aV を発現ベクターにサブクローニングした後、強発現させた培養細胞系を構築し、ニワトリグレリンによる細胞内カルシウム応答を調べたところ GHS-R1a を発現させた細胞ではカルシウム濃度が上昇したが、GHS-R1aV を発現させた細胞ではカルシウム濃度に変化が見られなかったことから GHS-R1a がグレリンの特異的受容体である事が証明された。また哺乳類では報告されていないが、ニワトリ GHS-R1a は親和性が低いながらも後述するモチリンと結合し作用する特異な現象が見られたが、これは Figure 1 に示した第 1 細胞外領域の相同性が関与しているものと考えられる。mRNA 発現解析、すなわちリアルタイム PCR によれば GHS-R1a mRNA は種々の組織において発現が見られたが、特に下垂体、脳、肝臓、十二指腸での発現が高い様式を呈していた。また GHS-R1a の C 末端部に対するポリクローナル抗体を作成し、下垂体切片の免疫染色を行ったところ、Cephalic lobe よりも Caudal lobe に多くの免疫陽性の細胞群が検出された。これはリアルタイム PCR による結果と一致していたことから、体内で最も成長ホルモンを産生する器官である下垂体において Caudal lobe における成長ホルモンの分泌はグレリン/GHS-R1a により促進されることが推測される。

ニワトリ MTL-R は cDNA クローニングの結

果、349 アミノ酸残基よりなる7回膜貫通型の構造を有していたが、ヒト及びウサギ MTL-R に比べモチリンの作用に重要とされる第2細胞外ループが短い特徴を有していたことから、動物種によるリガンドの特異性は同部位が重要であることが推察される。ニワトリ MTL-R を発現ベクターにサブクローニングした後、強発現させた培養細胞系を構築し、ニワトリモチリンによる細胞内カルシウム応答を調べたところ、グレリン同様、高親和性に細胞内カルシウム濃度が上昇したことからクローニングされた MTL-R はモチリンの特異的受容体である事が証明された。リアルタイム PCR によるニワトリ各組織における発現解析により、MTL-R mRNA は3週齢では腺胃、十二指腸で高い発現が見られた。発育による変動を調べたところ、腺胃および十二指腸では孵化前(19日齢)に最も高い発現が見られ、孵化後減少し、8週齢以降51週齢に至るまで発現が低下した。したがって MTL-R は孵化前からの消化管機能の調節に関与していると考えられる。

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4件)

1. Mori N, Lee P, Muranaka S, Sagara F, Takemitsu H, Nishiyama Y, Yamamoto I, Yagishita M, Arai T. Predisposition for primary hyperlipidemia in Miniature Schnauzers and Shetland sheepdogs as compared to other canine breeds. *Res Vet Sci.* 2010 88:394-9. 査読有
2. Hatano Y, Mori N, Asada M, Mori A, Yamamoto I, Muranaka S, Kojima M, Kigure M, Yagishita M, Sako T, Arai T. Hypertriglyceridemia with increased plasma insulin concentrations in cats. *Res Vet Sci.* 2010 88:458-60. 査読有

3. Yamamoto I, Kimura N, Arai T, Tanaka M. cDNA cloning and mRNA expression of bovine GPR39. *J Vet Med Sci.* 2009 71(5):641-4. 査読有

4. Yamamoto I, Kaiya H, Tsutsui C, Sakai T, Tsukada A, Miyazato M, Tanaka M. Primary structure, tissue distribution, and biological activity of chicken motilin receptor. *Gen Comp Endocrinol.* 2008 156(3):509-14. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 寺門邦彦、余戸拓也、土田修一、山本一郎、根津欣典、原田恭治、原 康、新井敏郎、多川政弘 犬の組織におけるアクアポリン(AQP)5の発現 2010/3/26-28 第149回日本獣医学会 東京
2. 武光浩史、森伸子、相良芙美、山本一郎、森昭博、Lee Peter、新井敏郎、ランド ジャッキー 猫の肥満・インスリン抵抗性発症メカニズムの遺伝子解析 2009/9/25-27 第148回日本獣医学会 鳥取
3. 森伸子、武光浩史、相良芙美、山本一郎、森昭博、Lee Peter、村中史朗、八木下充、新井敏郎 犬の高トリグリセリド血症の新しい診断基準 2009/9/25-27 第148回日本獣医学会 鳥取
4. 李 周煥、鄭 眞淑、山本 一郎、撫 年浩、新井 敏郎、木村 信熙 ホルスタイン種の胸最長筋内脂肪酸組成に対する SCD と FASN 遺伝子多系の影響 日本畜産学会 111 回大会 沖縄 2009 年 9 月 26-29 日
5. 新井敏郎、森 伸子、村中志朗、波多野 豊、森 昭博、山本一郎、高山美知雄、八木下 充 犬の代謝性疾患の診断基準策定とその応用 2008/9/24-26 第146回日本獣医学会 宮崎
6. 朝田美穂、坂本佑希乃、森 伸子、波多野 豊、森 昭博、山本一郎、新井敏郎、八木下 充 猫の代謝性疾患の診断基準策定と肥満猫への

応用 2008/9/24-26 第146回日本獣医学会
宮崎

7. 森 伸子、波多野 豊、山本一郎、西山和貴、
新井敏郎、八木下 充 新たに策定した血液
代謝ハラメータ診断基準に基づく犬の肥満
および糖尿病 2008/9/24-26 第146回日本
獣医学会 宮崎

8. Yamamoto I, Tsukada A, Arai T, Tanaka M.
cDNA cloning and mRNA expression profiles
of chicken neuromedin U receptors (NMUR1
and NMUR2). 13th ISACP 10th ESVCP 8th AECCP
7th APP congress. Barcelona Spain. 2008
Sep 30 - Oct 3.

[図書] (計0件)

[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

山本 一郎 (YAMAMOTO ICHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：00424763

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：