

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏名	ZHANG SHUANGYI
学位の種類	博士（獣医学）
学位授与の条件	酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当
学位論文の題目	Identification of motilin and ghrelin and their roles in regulation of gastrointestinal motility in the pheasant (キジにおけるモチリン、グレリンの同定とそれらの消化管運動調節における役割の解明)
審査委員	
主査教授	北澤多喜雄（獣医薬理学）
副査教授	寺岡 宏樹（獣医薬理学）
副査教授	翁長 武紀（獣医栄養生理学）

IDENTIFICATION OF MOTILIN AND GHRELIN AND THEIR ROLES IN REGULATION OF GASTROINTESTINAL MOTILITY IN THE PHEASANT

Rakuno Gakuen University Graduate School of Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Laboratory of Veterinary Pharmacology

Shuangyi Zhang

Motilin, a 22-amino-acids peptide hormone, plays a physiological role in the regulation of gastrointestinal (GI) motility in several mammals through activating the motilin receptor (MLNR, GPR38) located on enteric neurons and smooth muscle cells. Motilin is thought to be an endogenous regulator of phase III activity of the interdigestive migrating motor complex in the stomach of humans, dogs and house musk shrews. The presence of the motilin system (motilin and MLNR) has been reported in some birds (chickens and quails), but it has not been investigated extensively in reptiles, amphibians and fish. In birds, motilin is able to cause contraction of the GI tract in a region-dependent manner (small intestine > proventriculus >> crop and colon) and mediates the rhythmic oscillatory complexes observed in the small intestine in fasting periods of chickens. Motilin has been also proposed to be a GI motility-regulating hormone in the avian GI tract. However, a study using different species is needed to understand the function of motilin in the regulation of GI motility in birds because previous studies have only been conducted in chickens and quails.

Ghrelin, a natural ligand for growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a), has been identified in the gastric mucosa of mammals and non-mammals and has been shown to be a gut peptide with multiple functions including regulation of growth hormone (GH) release, glucose homeostasis, food intake, endocrine and exocrine pancreatic functions, cardiac function and regulation of GI motility. Since ghrelin shows structural homology with motilin and GHS-R1a shows structural homology with MLNR and both peptides are thought to be derived from the same ancestor gene, the GI motility stimulatory action of ghrelin has been investigated in humans and some experimental animals including rodents. Although there are some species-related differences in the actions of ghrelin on GI motility, ghrelin is also thought to be a GI motility-regulatory peptide. In chickens, it was found that ghrelin causes contraction in the crop, proventriculus and colon through the activation of GHS-R1a. However, ghrelin did not cause any contraction in the GI tract of Japanese quails despite

the fact that GHS-R1a mRNA is expressed in the GI tract. Due to the contrastive actions of ghrelin in the chicken and quail GI tracts, examination of the effects of ghrelin on GI contractility in other avian species is needed to determine the general actions of ghrelin on contractility of the avian GI tract.

In the present study, the pheasant (*Phasianus colchicus versicolor*) was selected as another avian species because pheasants belong to the same order *Galliformes* that chickens and quails belong to and it would be possible to compare the actions of motilin and ghrelin among closely related species. First, the primary structures of motilin and ghrelin in the pheasant were determined by molecular cloning. Then the effects of motilin and ghrelin and their interaction were examined in isolated GI strips of the pheasant.

In chapter 1, the background and objective of the study are introduced.

In chapter 2, identification of the motilin gene in the pheasant by molecular cloning and the actions of motilin on contractility of GI strips examined *in vitro* are described. Molecular cloning indicated that the deduced amino acid sequence of the pheasant mature motilin was a 22-amino-acid peptide, FVPFFTQSDIQKMQEKERIKGQ, and the gene was expressed mainly in the small intestine (duodenum, jejunum and ileum). The expression levels in other regions of the GI tract and in the brain, heart, lung and liver were very low. In *in vitro* studies using pheasant GI strips, chicken motilin and pheasant motilin caused contraction of the proventriculus and small intestine with almost the same affinity, whereas the crop and colon were almost insensitive. The ranking order of contraction was ileum = jejunum = duodenum > proventriculus >> crop = colon. Human motilin, but not erythromycin (an MLNR agonist), caused contraction of the pheasant small intestine, but a high concentration was needed for human motilin. The ranking order of motilin peptides in the pheasant small intestine (pheasant motilin=chicken motilin>human motilin) was different from that in the rabbit duodenum (human motilin> pheasant motilin=chicken motilin). Chicken and pheasant motilin-induced contractions in the proventriculus and ileum of the pheasant were not inhibited by the mammalian MLNR antagonists GM109 and MA2029. These results indicated that the MLNR structure in pheasants is different from that in rabbits (mammals). Neither atropine (a cholinergic muscarinic receptor antagonist) nor tetrodotoxin (a neuron blocker) inhibited the responses to chicken and pheasant motilins in the ileum, but both drugs decreased the responses to motilin in the proventriculus, suggesting that the contractile mechanism of motilin in the proventriculus was neurogenic, different from that in the small intestine (myogenic). These results suggested that motilin is widely present in

the small intestine of avian species and causes contraction of the GI tract in a region-dependent manner. The highest responsiveness to motilin in the small intestine suggests that motilin is a GI motility-regulating hormone and that the small intestine is a main target organ of motilin in birds.

In chapter 3, identification of the ghrelin gene in the pheasant proventriculus by molecular cloning and the actions of ghrelin on contractility of GI strips examined in an *in vitro* experiment are described. Molecular cloning indicated that the deduced amino acid sequence of the pheasant mature ghrelin was a 26-amino-acid peptide, GSSFLSPAYKNIQQKDKTRKPTGRLH, and ghrelin was localized mainly in the proventriculus as in other avian species. Ghrelin-immunopositive cells were detected in the mucosal layer of the proventriculus, and their shape was a round, closed type. They were stained by a specific antibody for decanoyl ghrelin but not by a specific antibody for octanoyl ghrelin. Ghrelin-immunopositive cells were also detected in the duodenum by an antibody for unacylated ghrelin but not by antibodies for octanoyl ghrelin and decanoyl ghrelin. Chicken ghrelin, quail ghrelin and rat ghrelin (1 μ M) did not cause contraction in any regions of the pheasant GI tract. A comparison of the effects of ghrelin in three different avian species (chicken, quail and pheasant) suggests that there is species-dependent variation in the responses to ghrelin. Although ghrelin-sensitive (chicken) and ghrelin-insensitive (quail and pheasant) groups were identified in avian species, the physiological meaning for different actions of ghrelin in the GI tract was not clarified in this study.

Since an interaction of ghrelin and motilin has been reported in dogs and house shrews, the interaction of the two peptides was also examined in the pheasant GI tract. The chicken motilin-induced contraction was not modified by ghrelin pretreatment, and ghrelin also did not cause any contraction in the presence of motilin, suggesting that there was no interaction between the two peptides in the pheasant GI motility.

In conclusion, motilin and ghrelin were shown to be present in the pheasant. A contraction study indicated that motilin caused contraction of the pheasant GI tract in a region-dependent manner similar with chickens and quails. However, ghrelin was ineffective, indicating that ghrelin-related modulation of GI motility that is observed in chickens might not be common in avian species. Taken together, the results suggested that motilin might be a common regulator of GI contractility, especially in the small intestine of birds. However, further studies using avian species other than chickens, quails and pheasants are needed to determine the general physiological roles of motilin and ghrelin in the avian GI tract.

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

学位申請論文は英文で4章から成り立っている。1章ではモチリンとグレリンのバックグラウンドについて構造の種差や消化管運動調節作用への関与等を述べ、比較生物学的見地から非哺乳動物(特に鳥類)での研究の必要性とキジを選択した理由が述べられている。2章ではまずキジでモチリン構造を決定し、その分布、消化管収縮作用とその作用機序をヒト、ニワトリモチリンとの比較を行い、モチリンが小腸を強く収縮させることを示した。3章ではキジ腺胃からグレリンを同定し、その分布と消化管収縮作用の有無について検討し、鳥類ではモチリンと異なりグレリンにより消化管が収縮する種と収縮しない種があることを示した。4章は全体のまとめとなっている。本論文は、学位論文としての体裁が整えられており、ニワトリとウズラが中心だった鳥類でのモチリン/グレリンの比較生物学的研究に新たにキジを加えたものであり、両ペプチド作用の比較からその生理的意義について新たな知見を加えた。

研究の背景と目的

モチリンは22個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、哺乳類では空腹期に胃腸管に出現する伝播性強収縮の mediator と言われている。一方、グレリンはモチリンと類似の構造を有し消化管の運動調節だけではなく内分泌調節、代謝調節など幅広い生理作用を有する。モチリン、グレリンの研究はこれまで主に哺乳類を用いて行われてきたが、分子生物学的な手法により非哺乳類でも両ペプチドの存在が報告され、系統発生、比較生物学的な見地から、内分泌や消化管収縮に与える作用が注目されてきている。しかしながら、生理学的役割の検討に使用できる動物種は限られており鳥類ではニワトリとウズラでの報告しかないのが現状であり、あと数種類動物種を追加して検討を行い作用の類似性と相違性を明らかにし、鳥類における両ペプチドの作用を推定することが必要である。本研究では、定期的に手に入れることができる実験動物としてキジに注目し、キジのモチリン、グレリンを同定した後にそれぞれのペプチドの摘出胃腸管に対する作用を検討し、ニワトリとウズラでの成績と比較しながら鳥類の消化管収縮調節におけるモチリン、グレリンの機能を明らかにすることを目的とした。

研究の成果

キジの12指腸粘膜から22個のアミノ酸からなるキジモチリンを同定した(FVPPFFTQSDIQKMQEKERIKGQ)。鳥類のモチリンはアミノ酸構造の種差が少なく、今回同定したモチリンは、ニワトリ、ウズラモチリンとは1-2個のアミノ酸残基が異なるのみであり七面鳥とは構造が一致していた。分布は、小腸(12指腸、空腸、回腸)が主で

あり哺乳類、他の鳥類での分布様式と一致していた。キジモチリン、ニワトリモチリンは、ほぼ同等の力価でキジ小腸に強い収縮を、腺胃に弱い収縮を誘起したが、ヒトモチリンの活性は低く、哺乳類の消化管でモチリン受容体の作動薬として働くエリスロマイシンは収縮を誘起しなかった。また、小腸では平滑筋上、腺胃ではコリン作動性神経上にモチリンの作用点(受容体)があると推察された。哺乳類モチリン受容体の遮断薬、GM109, MA2029はキジ小腸のモチリン誘発性収縮を抑制しなかった。受容体遮断薬とエリスロマイシンの成績からキジモチリン受容体は、ニワトリモチリン受容体と同様に哺乳類とは異なる構造を有すると推察された。次いでキジにおいてもグレリンの構造を同定し(GSSFLSPAYKNIQQQKDTRKPTGRLH) 1-7位(GSSFLSP)の構造は鳥類で保存されていることを明らかにした。グレリンは腺胃の粘膜に多く発現し3位セリンはデカン酸で修飾されている可能性が示された。鳥類(ニワトリ、ウズラ)グレリン、ラットグレリンはキジでどの消化管部位においても収縮を誘起しなかった。この結果は、ニワトリではなくウズラの成績と一致していた。キジ胃腸管で、モチリンとグレリンに相互作用(抑制または増強)が見られるか否か検討したが、相互作用は見られなかった。3種類の鳥類の比較ではあるが、グレリンに感受性を示す種(ニワトリ)と示さない種(キジ、ウズラ)が存在することを示した。

研究の評価

モチリン、グレリンの作用は哺乳類では広い動物種で検討されその生理的役割が解明されつつある。分子生物学的、免疫組織化学的検討から両ペプチドは哺乳類だけでなく魚類から鳥類まで幅広く存在する活性物質であることが分かってきているが、どのような生理的役割を持っているかの解析はまだ研究途上である。鳥類での研究は、ニワトリ、ウズラを用いて *in vitro* で行われたものが主で、モチリンは両種で消化管を収縮させるが、グレリンはニワトリ消化管を収縮させるが、ウズラでは感受性を示さないことから、両ペプチドの役割を解明するには、更に動物種を追加して検討する必要がある。本論文ではキジを実験動物として使用し、両ペプチドがキジにも存在し他の動物種と同様な組織分布を示すこと、モチリンはニワトリ、ウズラでの成績と一致して、小腸に強い収縮を誘起するが、グレリンは収縮を誘起しないこと、また両ペプチド間に相互作用がないことを示した。これまでの鳥類での成績をまとめると、鳥類でモチリンは小腸の運動調節に関与するが、グレリンは必ずしも消化管運動の調節因子ではない可能性が示された。更に、他の鳥類種を用いて両ペプチドの作用の類似性と相違性の検討を続けることが重要であることも示唆した。それ故、本論文は今後のモチリン、グレリンの比較生物学的分野の研究の発展に寄与するものと判断した。

学位論文の一部を公表した論文

Zhang S, Okuhara Y, Iijima M, Takemi S, Sakata I, Kaiya H, Teraoka H, Kitazawa T. Identification of pheasant ghrelin and motilin and their actions on contractility of the isolated gastrointestinal tract. *Gen Comp Endocrinol*. 2020; 285: 113294. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.113294.

他に参考論文 3 編 (FA 2 編)

以上のことから、ZHANG SHUANGYI 氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員3名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2021年 2月 8日

審査委員

主査 教授 北澤多喜雄

副査 教授 寺岡 宏樹

副査 教授 翁長 武紀