氏　　名	筒井　千尋
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 718 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	スンクス（*Suncus murinus*）を用いたモチリンの基礎的研究
論文審査委員	委員長　教　授　坂井　貴文
	委　員　教　授　井上　金治
	委　員　教　授　西垣　功一
	委　員　准教授　足立　明人
	委　員　准教授　小林　哲也

論文の内容の要旨

モチリンは、1970 年代に発見された 22 アミノ酸残基のペプチドホルモンであり、空腹時に phase Ⅲを伴った典型的な伝播性消化管収縮運動（Migrating Motor Complex; MMC）を惹起するホルモンとして知られている。モチリンは現在までにヒトの他にウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコなどの比較的大型の哺乳類とニワトリなどの鳥類において遺伝子およびアミノ酸配列が同定されている。消化管運動に対するモチリンの生理学及び薬理学的な研究は主にイヌをモデル動物として行われ、成功を収めてきたが、その発現調節機構や生理作用機構は未だ明らかになっていない部分が多い。これはイヌなどの比較的大型の動物は、その大きさゆえに、細胞生物学または分子生物学的解析には不利である事が原因のひとつとしてあげられる。そのため、モチリン研究の更なる進展のためには、細胞から個体まで一貫して研究できる小型モデル動物が必要となっている。しかし、最も有用な実験動物であるラット・マウスでは、モチリンおよびモチリン受容体遺伝子の同定は現在まで成功しておらず、ラット・マウスをモチリン研究に用いることが出来ない。このことにより、モチリン、グレリンを同時に産生する適当な実験動物がおらず、モチリンの作用機序だけでなくモチリン - グレリンファミリーの相互作用の詳細な検討は現在困難となっている。本研究ではモチリン - グレリンファミリー研究のモデル動物として、日本で開発された実験動物である、スンクス（*Suncus murinus*）に着目した。スンクスは食虫目トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属の小型哺乳類で、薬物や動揺などの刺激により嘔吐をすることから、これまで主に嘔吐機構の研究に用いられてきた。本研究では、スンクスがモチリンを産生し、モチリンおよびグレリンに反応して消化管収縮が起こることを証明するために一連の実験を行った。

本研究ではまず、スンクスと同じ食虫目に属するハリネズミ（Hedgehog）のゲノムデータベースからプライマーを設計し、スンクスモチリンの部分配列を PCR クローニング法により取得した。その配列を元に 5’ - RACE および 3’ - RACE 法を用いて、モチリン遺伝子の全領域クローニングを行い、全長 518 bp のスンクスモチリン遺伝子を同定した。この塩基配列から予測したモチリンのアミノ酸配列は、成熟モチリン部分においてヒトモチリンと 86％の高い相同性を有し、成熟モチリンが切り出されるための二塩基配列（Lys - Lys）も保存されていた。

続いて、スンクスモチリンの発現分布、モチリン細胞の形態と分布について検討した。スンクスの全身

組織をサンプリングし、RT - PCR 法を用いてモチリン mRNA 発現の分布を調べた。スンクスには盲腸が存在せず、目視的に小腸、大腸の区別がつきにくいことから、消化管については、胃体部、前庭部および 6 等分した腸管の全 8 部位から組織を採取した。Real - time PCR による定量の結果、消化管におけるモチリン mRNA 発現は、殆どが上部腸管に限局しており、この結果はウサギ抗ブタモチリン血清を用いた免疫組織化学によるモチリン産生細胞、および cRNA プローブを用いた *in situ* hybridization の形態計測結果とも一致していた。スンクス消化管におけるモチリン産生細胞およびモチリン mRNA 発現細胞は腸管神経叢には見られず、粘膜内に閉鎖型または開放型細胞として確認され、その形態はこれまでに他の哺乳類で報告されているものと類似していた。また、消化管以外では延髄、視床下部、性腺などに低レベルではあるものの、モチリン mRNA 発現が確認された。

さらに、塩基配列から予測した２２アミノ酸残基のペプチドを合成し、スンクス胃に対する収縮作用をマグヌス管を用いた *in vitro* 実験にて検討したところ、モチリンは 10^{-9} M から濃度依存的にスンクス胃を収縮させた。また、スンクス胃およびウサギ回腸に対してスンクスモチリンとヒトモチリンはいずれも同等の活性を有することが明らかになった。このことから、著者はクローニングにより取得した遺伝子および予測したペプチド配列は、スンクスモチリンであると結論付けた。一方、同時期に当研究室でクローニングおよびペプチドの同定に成功したスンクスグレリンについても、スンクス胃収縮効果を検討したが、グレリン単独投与は胃収縮を惹起しなかった。しかし、グレリンをスンクスモチリンと共投与したところ、グレリン 10^{-9} M 存在下で、モチリン容量反応曲線が左側へシフトした。また、モチリン前処理を行うことでグレリンも容量依存的にスンクス胃を収縮させ、モチリンとグレリンは胃収縮に対して相乗的に作用することが明らかとなった。

これらの研究により、モチリンおよびモチリンとグレリンに関して新しい知見が得られただけでなく、スンクスがモチリン - グレリンファミリー研究のモデル動物として有用であることが明らかになった。今後、*in vivo* 実験系と併せた研究を行っていくことにより、モチリンの作用機序および消化管運動制御機構の解明がより進展することが期待出来る。

論文の審査結果の要旨

筒井千尋氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成２１年２月１０日に理学部９番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

消化管ホルモンのひとつとして知られているモチリンは、1970 年代にカナダの JC. Brown により単離同定されたペプチドホルモンであり、胃より分泌されるグレリンとファミリーを形成する。モチリンは空腹時に約 100 分間隔で十二指腸から分泌され、それに同期して胃より phase III 収縮を伴った伝播性消化管収縮運動（Migrating Motor Complex）が惹起される。現在までのイヌ、ヒト、ウサギを用いた *in vivo*、*in vitro* 研究から、モチリンによる消化管運動刺激は、(1)消化管平滑筋、(2)消化管筋層間神経叢、(3)求心性迷走神経　を介することが明らかにされてきた。しかし、これらの経路は複合的に刺激されていることや、動物の種類によって作用経路が異なることに加えて、*in vivo*、*in vitro* で利用できる適当なモデル動物が存在しないことから、その解析は進んでいない。特に、最も有用な実験動物であるラット･マウスを含む齧歯類は、モチリンおよびモチリン受容体を産生しておらず、モチリン関連の実験に利用できないことが研究の進展をさらに困難にさせている。このような状況をふまえ、申請者はモチリン研究に利用可能な小型実験動物の検索を行い、スンクス（*suncus murinus*）を見いだした。本研究では、スンクスモチリンが産生され生理活性を持つことと、スンクス胃がモチリンーグレリンファミリーペプチドにより収縮することを証明するための一連の研究を行っている。本論に述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第１章では、PCR クローニング法および RACE 法によるスンクスモチリン遺伝子配列の同定について記述している。申請者は、スンクスと同じ食虫目に属するハリネズミ（hedgehog）のゲノムデータベースと他の哺乳類モチリン遺伝子からのオルソログ配列情報を参考にしてプライマーを設計し、スンクス上部小腸から得た cDNA をテンプレートとした PCR を行った。その後､取得した部分配列を元に 5’-RACE および 3’-RACE を行い、全長 518 bp のスンクスモチリン遺伝子を同定した。得られた塩基配列は、他の動物種に比較して、成熟モチリン部分とその上流のシグナルペプチド部分で高い相同性を示した。また、申請者は最近公開されたトガリネズミゲノムデータベースを参考にして、エキソンーイントロン構造を推定し、スンクス成熟モチリン部分は、他の動物種と同様に、エキソン２とエキソン３にまたがって存在することを議論している。一方、得られた塩基配列から予測したモチリンのアミノ酸配列は、成熟モチリン部分でヒトモチリンと 86 %の高い相同性を有し､プロモチリンから成熟モチリンが開裂するための２塩基性アミノ酸配列（Lys-Lys）も他の動物と同様に保存されていることを明らかにした。

第２章では、スンクスにおけるモチリン発現および産生と、モチリンのスンクス胃に対する収縮刺激作用を記述している。まず、スンクスモチリン mRNA の発現分布とモチリン細胞の形態と分布について、RT-PCR 法、定量 PCR 法、免疫染色法、*in situ* hybridization 法（ISH）を用いて検討している。定量 PCR の結果、消化管以外の mRNA 発現は検出限界以下であったのに対し、消化管には高い発現が認められ、それも殆どが十二指腸に相当する上部小腸に限局することが示された。この結果は、免疫染色および ISH から得られたモチリン産生・発現細胞密度分布とほぼ一致していた。また、スンクス消化管モチリン産生細胞は他の哺乳類と同様に、開放型と閉鎖型に分類できた。以上の結果から、申請者は、スンクスはヒトやイヌと同様に、モチリンを上部小腸粘膜で産生・分泌していること、また、スンクスはモチリン研究のモデル動物

として利用可能であることを指摘している。続いて、スンクスモチリン mRNA 塩基配列から予測した２２アミノ酸残基のペプチドを合成し、organ bath を用いた *in vitro* 実験を行い、スンクスモチリンがヒトモチリンと同等の生理活性を有することに加えて、スンクス胃はモチリンにより容量依存性に収縮することを証明した。また、低濃度のモチリン存在下では、グレリンの累加投与でスンクス胃が容量依存性に収縮を始めること、およびグレリン刺激後にはモチリンの収縮作用が増強されることを示した。これは、今までに全く報告されていない新しいモチリンファミリーの作用であり、極めて重要な知見と言える。

以上をまとめると、本論文により示されている新たな知見は、(1) スンクス（*Suncus murinus*）はモチリン遺伝子を発現しており、その主な発現、産生部位は上部小腸に限局すること、(2) スンクスモチリンペプチドはヒトモチリンと同等の消化管収縮活性を有し、*in vitro* においてスンクス胃を濃度依存的に収縮させること、そして (3) モチリンとグレリンはスンクス胃収縮に対して相乗的に作用する、という３点である。これらの結果は、モチリンファミリー研究に新しい手法を提供すると共に、モチリンとグレリンの協調作用の存在を明らかにしたもので、高い意義を有すると言える。また、筒井氏は本論文の内容を第１著者として査読付き英語論文に発表しており、他に関連または参考論文として査読付き英語論文４編を発表している。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。